

Aus dem Institut für Experimentelle Tumorforschung
Sektion für Molekulare Onkologie
Im Krebszentrum Nord-CCC
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Campus Kiel – Haus 18
Arnold-Heller-Straße 3
24105 Kiel

(Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff)

CD95 und TRAF2 fördern die Invasivität von Pankreaskarzinomzellen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
KRISTIN KARSTEN
aus Rotenburg/Wümme
Kiel, 2010

1. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Anna Trauzold
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Gramatzki
- Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2010
- Zum Druck genehmigt, Kiel, den 26.11.2010

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	Das Pankreaskarzinom.....	3
2.2	Apoptose	4
2.3	Das CD95/CD95L-System.....	5
2.4	Apoptose-Resistenzmechanismen.....	6
2.5	TRAF2	8
2.6	Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	9
3	MATERIAL UND METHODEN.....	10
3.1	Bezugsquelle der Chemikalien	10
3.2	Zellkulturmedien und Zusätze	10
3.3	Antikörper und rekombinante Proteine	11
3.4	Labormaterialien.....	12
3.5	Zelllinien	13
3.6	Zellkultur.....	13
3.7	Molekularbiologische Routinemethoden.....	15
3.8	Western Blot und Immundetektion.....	16
3.9	DNA-Fragmentationsassay (Jam-Assay).....	17
3.10	³ H-Thymidin-Proliferationsassay.....	18
3.11	Electrophoretic mobility shift assay	18
3.12	Bestimmung der uPA- und IL8-Konzentration in Zellkulturüberständen	19
3.13	Invasionsassay	20
3.14	Real-time RT-PCR	20
4	ERGEBNISSE	22
4.1	TRAF2 wird in Pankreaskarzinomen und in Pankreaskarzinom-Zelllinien überexprimiert.....	22

4.2	Regulation der TRAF2-Expression in Pankreaskarzinomzellen	23
4.3	Generierung einer stabilen Colo357/TRAF2 Zelllinie.....	26
4.4	TRAF2-vermittelte Apoptose-Resistenz.....	27
4.5	Überexpression von TRAF2 erhöht das invasive Potential der Tumorzellen.....	28
4.6	CD95-Stimulation steigert das invasive Potential von Pankreaskarzinomzellen	30
4.7	Demonstration der Invasivitätssteigerung von Colo357/TRAF2 Zellen durch CD95-Stimulation anhand eines Invasionsassays	33
5	DISKUSSION	35
5.1	TRAF2 als Schlüsselprotein der Apoptose-Resistenz von Pankreaskarzinomzellen	35
5.2	Mechanismen, die im Pankreaskarzinom zur TRAF2-Überexpression führen.....	36
5.3	Ursachen für eine gesteigerte Invasivität von Pankreaskarzinomzellen	38
5.4	Mechanismen CD95-vermittelter Apoptose-Resistenz durch TRAF2- Überexpression.....	39
5.5	Fazit.....	41
5.6	Medizinische Relevanz.....	41
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	42
7	LITERATUR.....	43

1 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AP1	activating protein 1
APAF1	apoptotic protease activating factor-1
Bcl-2	B-cell lymphoma (protein)-2
Bcl-xl	B-cell lymphoma (protein)-xl
Bid	Bcl-2 interacting domain death agonist
CD95L	CD95 Ligand
cDNA	cyclic desoxyribonuclein acid / zyklische Desoxyribonukleinsäure
CT	cycle threshold
DISC	death-inducing-signalling-complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
FADD	Fas-associated death domain containing protein
FAP-1	Fas-associated phosphatase 1
FCS	fetal calf serum
FLIPs	FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme like protease (FLICE/Caspase-8)-inhibitory proteins
IAPs	inhibitor of apoptosis protein
IL	Interleukin
IL-1R	IL-1 Rezeptor
I- κ B	inhibiting <i>kappa</i> B
JNK	cJun N-terminale kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MMPs	Matrix Metalloproteinasen
NF- κ B	nuclear factor <i>kappa</i> B
PBS	phosphate buffered saline
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PKD1	Proteinkinase D1
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SAPK	stress activated phospho-kinases

SDS	sodium-duodecylsulfate
siRNA	short interfering RNA
tBid	truncated Bcl-2 interacting domain death agonist
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
TNFL	TNF Ligand
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAIL	tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
uPA	urokinase-type plasminogen activator
VK	Vektorkontrolle
WT	Wildtyp
XIAP	crosslinked inhibitor of apoptosis protein
zVAD	carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone

2 Einleitung

2.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom stellt eine der bösartigsten Tumorerkrankungen der westlichen Welt dar. Mit circa 90% nimmt das duktale Adenokarzinom den größten Anteil unter den Pankreaskarzinomen ein [1].

Obwohl das Pankreaskarzinom in Deutschland prozentual bei Männern nur den zehnten Platz (2,7%) und bei Frauen den neunten Platz (3,2%) in der Inzidenzstatistik für Tumorerkrankungen einnimmt, belegt es in der Auflistung für Krebssterbefälle bei Männern (5,8%) und bei Frauen (6,7%) Platz vier [2]. Männer sind von der Erkrankung etwa 1,5-fach häufiger betroffen als Frauen und das mittlere Erkrankungsalter liegt in Deutschland bei Männern bei 69, bei Frauen bei 76 Jahren [2]. Die relative 5-Jahres Überlebensrate ist trotz chirurgischer und chemotherapeutischer Therapieversuche mit 6-8% äußerst niedrig [2]; unbehandelt liegt sie nur bei 1-2%. Das mediane Überleben ohne therapeutische Intervention beträgt nur etwa 3 Monate [3]. Ursächlich für diese extrem schlechte Prognose sind vor allem der relativ späte Diagnosezeitpunkt und der Mangel an adäquaten Therapieoptionen. Der späte Diagnosezeitpunkt wird durch die initiale Symptomlosigkeit der Erkrankung bedingt. So tritt beispielsweise ein Ikterus bei überwiegender Lokalisation der Tumore im Bereich des Pankreaskopfes erst in späteren Stadien auf, wenn der Tumor in der Mehrzahl der Fälle bereits lymphogen und hämatogen metastasiert ist. Dies hat zur Folge, dass nur ca. 15-20% der Patienten bei Diagnosestellung operabel sind. Allerdings verstirbt auch dieses selektierte Kollektiv zum Großteil innerhalb der ersten sieben Jahre an seiner Erkrankung [4].

Die pathophysiologischen Grundlagen der Entstehung des Pankreaskarzinoms sind noch immer unklar. Neben genetischen Faktoren, Nikotinabusus und Adipositas ist die chronische Pankreatitis der einzige gut belegte Risikofaktor für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms [5].

Die hohe Toleranz des Karzinoms gegenüber gängigen Chemo-, Radio- und Immuntherapieansätzen spricht für eine ausgeprägte intrinsische Apoptoseresistenz der Pankreaskarzinomzellen. Dementsprechend konzentriert sich die aktuelle Forschung verstärkt auf diese Eigenschaft des Pankreaskarzinoms.

Die folgende Arbeit befasst sich mit den mechanistischen Grundlagen der Apoptoseresistenz von Pankreaskarzinomzellen. Ein tiefer gehendes Verständnis der molekularen Eigenschaften dieser Malignomzellen könnte einen weiteren Schritt auf dem Weg zur

Entwicklung neuer Therapieansätze und einer Verbesserung der bestehenden Therapieoptionen des Pankreaskarzinoms bedeuten.

2.2 Apoptose

Der Begriff Apoptose beschreibt eine genetisch festgelegte, regulierte Form des programmierten Zelltodes [6]. Carl Vogt beschrieb vor mehr als 160 Jahren erstmals, dass Zelltod zum normalen Gewebeüberleben gehört [7]. Der Begriff Apoptose wurde 1972 von Kerr, Wyllie und Currie eingeführt, die an toxinbehandelten Leberzellen Veränderungen beobachteten, die der Morphologie sterbender Embryonalzellen ähnelten [8].

Programmierter Zelltod kommt ubiquitär vor und spielt eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der normalen Gewebemöostase. Er reguliert nicht nur Proliferation und Differenzierung von Zellen sondern auch die Elimination infizierter und entarteter Zellen [9]. Ist die Regulation von Zellwachstum und Zellsterben gestört, können ungehemmtes Wachstum oder verminderter Zelltod im Gewebe Veränderungen verursachen, die letztendlich maligne Entartung zur Folge haben.

Viele gängige Tumorthera­pieansätze, wie Chemotherapie und Radiatio, zielen daher primär auf die Induktion von Apoptose ab. Allerdings entwickeln viele Tumore im Verlauf ihrer Progression verschiedene Mechanismen, die zur Apoptoseresistenz führen [10].

Prinzipiell gibt es zwei unterschiedliche Signalwege, die Apoptose auslösen können. Man unterscheidet den *extrinsischen* Weg, der über Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche initiiert und gesteuert wird und den *intrinsischen* oder *stressinduzierten* Weg, welcher mitochondrial vermittelt wird. Der *intrinsische* Weg kann beispielsweise auch durch Chemotherapeutika oder Radiatio induziert werden.

Beide Wege führen auf ihrer Endstrecke zur Aktivierung von sogenannten Caspasen (Cystein aspartyl-spezifische Proteasen), welche dann, im Sinne einer Kaskade, weitere Caspasen aktivieren und verschiedene zelluläre Substrate spalten. Dies führt zu den biochemischen und morphologischen Veränderungen, die für Apoptose charakteristisch sind und die letztlich mit der kontrollierten Eliminierung der Zelle bzw. des Zellverbandes enden. [11].

Der extrinsische Weg der Apoptoseinduktion erfolgt durch die Bindung spezifischer Liganden (CD95L (CD95 ligand), TNFL (tumor necrosis factor ligand), TRAIL (tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand)) an sog. Todesrezeptoren an der Zelloberfläche. Diese Bindung hat dann, über verschiedene Zwischenschritte, die Aktivierung der Apoptosekaskade zur Folge [11].

2.3 Das CD95/CD95L-System

Die cDNA (cyclic desoxyribonuclein acid) für den CD95-Rezeptor wurde im Jahre 1991 von Itoh et al. [12] aus T-Zell-Lymphom KT-3 Zellen isoliert und kloniert. Bei dem Rezeptor handelt es sich um ein Polypeptid aus 319 Aminosäuren mit einer einzelnen Transmembran-Domäne und einer extrazellulären Domäne, welche reich an Cystein-Resten ist [12]. Der CD95-Rezeptor ist heute einer der am besten charakterisierten Rezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie. In der Literatur gibt es verschiedene Bezeichnungen für das CD95/CD95L-System. Fas oder auch Apo1 sind weitere gebräuchliche Namen für den untersuchten Rezeptor, werden in dieser Dissertation aber nicht verwendet. CD95-Rezeptoren werden auf der Zelloberfläche als präassoziierte Homotrimere exprimiert [13, 14]. Im zytoplasmatischen Anteil der Rezeptoren befindet sich ein Bereich, der als Todesdomäne (DD, death domain) bezeichnet wird. Diese Region ist eine charakteristische Region für TNF-Rezeptoren [15]. Bindet ein Ligand an den Rezeptor, vereinigt sich dieser und bindet mit seiner Todesdomäne an die Todesdomäne des Proteins FADD (Fas-associated death domain containing protein). FADD ist durch seine sogenannte Todes-Effektor-Domäne (death effector domain, DED) zur Rekrutierung von Caspasen befähigt. Bindet Caspase-8, bezeichnet man den Zusammenschluss dieser Proteine als DISC (death-inducing-signalling-complex). Die Assoziation verschiedener Proteine am aktivierten CD95-Rezeptor wurde im Jahre 1995 von Kischkel et. al. beschrieben und der Begriff „DISC“ eingeführt [16]. Die beiden Moleküle FADD und Caspase-8 sind dabei Schlüsselkomponenten, allerdings können auch andere Caspasen, sofern sie eine Todeseffektordomäne besitzen, wie zum Beispiel Caspase-10, an die Todeseffektordomäne von FADD binden [17].

Man nimmt an, dass es bei ausreichend hoher lokaler Konzentration von Caspase-8, zur Autoproteolyse und konsekutiven Aktivierung von Caspase-8 kommt. Die Aktivierung von Caspase-8 hat dann die Induktion der „Apoptose-Kaskade“ zur Folge. In der CD95-vermittelten Apoptose unterscheidet man zwei unterschiedliche Zelltypen, abhängig von der durch den DISC produzierten Menge an aktivierter Caspase-8 [18]. In den sogenannten Typ-1 Zellen wird die Effektor-Caspase-3 direkt durch Caspase-8 gespalten. Hierdurch kommt es zum Anstoß der Apoptose-Maschinerie. Im Vergleich dazu ist in den Typ-2 Zellen, zu denen auch die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Pankreaskarzinomzellen gehören, auf Grund der niedrigen intrinsischen Menge an Caspase-8, eine „mitochondriale Verstärkerschleife“ zur suffizienten Induktion des Zelltodprogramms notwendig [18].

Die mitochondriale Verstärkerschleife verläuft initial über Spaltung von Bid (Bcl-2 interacting domain death agonist). Bid ist ein proapoptotisches Protein aus der Bcl-2 (B-cell lymphoma (protein) 2) Familie [19]. Die Proteine der Bcl-2 Familie nehmen eine zentrale Rolle in der

Regulation des intrinsischen bzw. mitochondrialen Apoptoseweges ein [20]. Bid ist ein multifunktionales Protein und hat neben seiner Funktion andere Proteine der Bcl-2 Familie zu binden, der Amplifikation von Caspase-Aktivierung und dem Transfer von Lipiden zwischen intrazellulären Organellen auch die Fähigkeit, mitochondriale Membranen für verschiedene Stoffe durchlässig zu machen [21]. In den Mitochondrien führt das proapoptotische Fragment tBid (truncated Bid) unter Anderem zur Freisetzung von Cytochrom C aus dem Zwischenmembranraum. Cytochrom C bindet im Zytosol vorliegendes APAF1 (apoptotic protease activating factor-1), ATP und Caspase-9. Der entstehende Komplex wird als Apoptosom bezeichnet. Hier findet die Aktivierung von Caspase-9 statt. In der Folge kommt es durch das Apoptosom zur Spaltung und konsekutiven Aktivierung der Effektor-Caspasen-3, -6 und -7. Dies führt zu einer sich selbst verstärkende Caspase-Kaskade [22-24]. Die Spaltung von „Todessubstraten“, DNA-Fragmentierung und Spaltung von Zytoskelettproteinen führen letztendlich zum Zelltod [24].

2.4 Apoptose-Resistenzmechanismen

Gesteigerte Apoptoseresistenz befähigt Krebszellen dem Immunsystem des Wirts und verschiedenen Therapieansätzen, wie Radiatio und Chemotherapie zu entkommen. In der Literatur sind eine Vielzahl von Mechanismen beschrieben, die eine verminderte Apoptosesensitivität bedingen. So kann es in einigen Tumorzellen nach Aktivierung des CD95-Rezeptors, statt zur Induktion der Apoptosekaskade, zur Hemmung des programmierten Zelltodes oder sogar zur Steigerung der (Tumor-)Zellproliferation kommen [25]. Des Weiteren gelang die Beobachtung, dass einige Tumorzellen, im Gegensatz zu ihren Ursprungszellen, keinen CD95-Rezeptor mehr auf der Zelloberfläche exprimieren und damit einen fundamentalen Defekt in ihrer Apoptosefähigkeit aufweisen [26, 27].

Pankreaskarzinomzellen exprimieren hingegen einen intakten CD95-Rezeptor und auch die Expressionsmenge unterscheidet sich im Vergleich zu gesundem Pankreasgewebe nicht [28].

Für andere Rezeptoren, wie zum Beispiel den TRAIL-Rezeptor, konnte demonstriert werden, dass bestimmte Rezeptormutationen eine Verminderung der Apoptoserate oder sogar zytoprotektive Eigenschaften zur Folge haben [29].

Durch FLIPs (FADD-like interleukin-1 -converting enzyme-like protease (FLICE/Caspase-8)-inhibitory proteins) besitzt die Zelle einen weiteren Mechanismus, um die Aktivität von Todesrezeptoren zu modulieren [30]. Die Struktur von FLIP-Proteinen erlaubt ihnen, an FADD im DISC zu binden und dort die Spaltung und Aktivierung von Caspase-8 zu hemmen [11].

In einigen Tumorzellen kommt es zu gesteigertem Zellüberleben, da nur eine geringe Menge an Caspase-8 exprimiert wird. Zusätzlich wurde die Überexpression von FLIPs und eine damit verbundene verminderte Caspase-8-Aktivität beschrieben [31-34].

Weitere wichtige Regulatorproteine auf tiefer gelegenen Ebenen der Signalkette sind die Mitglieder der Bcl-2 Familie, welche Apoptose auf dem mitochondrialen Level steuern [22, 23]. Proteine dieser Familie beeinflussen die Permeabilität mitochondrialer Membranen und lassen sich je nach ihrer Funktion in anti- und proapoptotische Proteine einteilen [11].

In Typ- Zellen kann die Überexpression von Bcl-xl (B-cell lymphoma (protein)-xl) [35] und die Induktion von PKC (Proteinkinase C) [36] die Freisetzung pro-apoptotischer Proteine aus den Mitochondrien hemmen und somit die Aktivierung von Caspase-9 und Caspase-3 verhindern.

PKC kann auf verschiedenen Ebenen in die Apoptosekaskade eingreifen. Auf zytoplasmatischer Ebene konnte gezeigt werden, dass es bei einer CD95-Stimulation zur Steigerung der Bid Spaltung kommt, wenn PKC gehemmt wird [37]. Auf Zellkernebene kann PKC zu einer gesteigerten NF- κ B (nuclear factor *kappa* B)-Aktivierung führen [38]. Die Aktivierung von NF- κ B kann über verschiedene Wege zu einer gesteigerten Apoptoseresistenz führen (siehe unten).

IAPs (inhibitor of apoptosis protein) stellen, durch ihre Fähigkeit an Caspasen zu binden und ihre Funktion zu modulieren, eine dritte wichtige Gruppe an Regulatorproteinen dar [11].

Durch die oben genannten Faktoren kann die Aktivierung des CD95-Rezeptors nicht wie erwartet zur Apoptose führen. Im Gegenteil konnte sogar eine antiapoptotische beziehungsweise proliferationsstimulierende Antwort beobachtet werden, die als Folge der Rezeptorstimulation auch Wachstum von Nerven, Regeneration und Proliferation ermöglicht [25].

Von einigen Forschungsgruppen wurde berichtet, dass es unter Bedingungen, unter denen Apoptose gehemmt wird, zur CD95-vermittelten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B kommt [37, 39-41]. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wird zusammengesetzt aus Hetero- oder Homodimeren von NF- κ B und ist ein Protein der REL-Familie. Proteine dieser Familie vermitteln Protein-Dimerisation, Kernimport und spezifische DNA-Bindung [42]. Er wird mit vielen Aspekten der Kanzerogenese in Verbindung gebracht, welche zur Proliferation und Apoptoseinhibition führen [43, 44]. Normalerweise liegt NF- κ B zytoplasmatisch gebunden an I- κ B (inhibiting *kappa* B) vor. Erst durch Phosphorylierung und Abspaltung von I- κ B wird es aktiviert und transloziert in den Kern, wo es die Transkription seiner Zielgene aktiviert [45]. Zu diesen Zielgenen gehören unter Anderem viele antiapoptotischen Gene wie IAPs, TRAF(TNF receptor associated factor)1 und TRAF2, Bfl-1/A1, Bcl-xl, FLIP und TRAIL [42]. Des Weiteren kommt es nach NF- κ B-Aktivierung zur Expression von Genen, die an Entzündungsreaktionen beteiligt sind [46].

2.5 TRAF2

Tumor necrosis factor (TNF)-receptor-associated factors (TRAFs) stellen eine Familie von zytoplasmatischen Adapterproteinen dar, welche die Signaltransduktion von Zelloberflächenrezeptoren nach intrazellulär vermitteln. Sie interagieren mit vielen Mitgliedern der TNF-Rezeptorfamilie und dem Interleukin-1-Rezeptor [47]. Allen TRAFs ist eine spezielle Anordnung von Aminosäuren an ihrem C-Terminus, welche als TRAF-Domäne bezeichnet wird, gemein. Diese ist für die Bindung an ihre spezifischen Rezeptoren erforderlich. Die TRAF-Domäne wird in zwei Subregionen unterteilt [48]. Die sogenannte TRAF-C-Region ist für die Homo- und Heterodimerisation von TRAF-Proteinen sowie für die Interaktion mit Zelloberflächenrezeptoren zuständig. Des Weiteren befähigt sie zur Rekrutierung weiterer TRAFs [49, 50]. Die N-terminale Region, TRAF-N, bildet eine sogenannte *Coiled-Coil*-Region [47, 48]. Die TRAF-Domäne liegt bei TRAF2 als Trimer vor [51]. Entfaltet wird die Coiled-Coil Region zu einer Einzelstrang α -Helix, die TRAF-C-Region formt ein 8-strängiges antiparalleles β -Faltblatt [51]. Durch das Vorliegen als Trimer hat die TRAF-Domäne bei TRAF2 die Form eines Pilzes, wobei die TRAF-C Domäne den Korpus und die TRAF-N Domäne den Stil darstellt. Mit Ausnahme von TRAF1 enthalten alle TRAFs außerdem eine N-terminale Ringfingerdomäne, die mit ihrer charakteristischen Anordnung von Cysteinen und Histidinen befähigt ist, Zinkionen zu binden und zu koordinieren [52].

TRAFs interagieren entweder direkt mit zytosolischen Domänen verschiedener TNF-Rezeptoren, die aufgrund der TRAF-Domäne bei TRAF2 optimalerweise als Trimer vorliegen, oder sie nehmen an der Signaltransduktion durch Interaktion mit Zytokin-Rezeptor-Komplexen teil [53]. TRAFs spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion vieler grundlegender biologischer Funktionen, wie der des Immunsystems, der embryonalen Entwicklung, der Stressantwort und dem Knochenmetabolismus. Zudem modulieren sie die Induktion von Zellüberleben, -proliferation, -differenzierung und -tod [54].

TRAF2 gilt als der charakteristische Vertreter der TRAF-Familie und ist Prototyp für die TRAF-vermittelte Aktivierung des NF- κ B- und des MAP(mitogen-activated protein)-Kinasen-Signalweges. TRAF2 findet sich in fast allen menschlichen Geweben und ist das am weitesten verbreitete TRAF-Protein [48]. Ihm wird vor allem eine zytoprotektive Rolle zugeschrieben. So kommt es beispielsweise in TRAF2-knock-out-Mäusen zu einer deutlichen Steigerung des TNF-induzierten Zelltodes. In diesen Tieren fand sich zudem eine Reduktion der TNF-induzierten Aktivierung von NF- κ B und JNK(cJun N-terminale kinase)/SAPK(stress-activated phospho-kinases) [55].

2.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Zellen des duktales Pankreasadenokarzinoms zeigen häufig eine gesteigerte Resistenz gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose [28]. Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass TRAF2 in Pankreaskarzinomen besonders häufig überexprimiert wird [56].

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit basiert auf diesem Ergebnis der Arbeitsgruppe von Fr. PD Dr Trauzold (Sektion Molekulare Onkologie, UKSH, Campus Kiel).

Folgende Fragen sollen im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet werden:

- Wie kommt es zur vermehrten Expression von TRAF2 in Pankreaskarzinomzellen?
- Welche Rolle spielt TRAF2 in der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose?
- Welche Eigenschaften von TRAF2 bedingen eine gesteigerte Apoptose-Resistenz in Malignomzellen?
- Welche Rolle kommt TRAF2 im Rahmen der Aggressivität und des Metastasierungsverhaltens dieser Tumore zu?

Wir glauben, dass das grundlegende Verständnis der molekularen Eigenschaften von Pankreaskarzinomzellen im Allgemeinen und ihrer ausgesprochenen Apoptoseresistenz im Speziellen eine wichtige Grundlage für die Entwicklung möglicher Therapieansätze dieser deletären Erkrankung darstellt.

3 Material und Methoden

3.1 Bezugsquelle der Chemikalien

AMAXA Nucleofection Kit	AMAXA, Köln
Bovines Serum Albumin (BSA)	Biochrom KG, Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
ECL TM /ECL TM plus (enhanced chemiluminescence)	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Großbritannien
Ethanol	Merck, Darmstadt
Lipofectamine 2000 Reagent	Life Technologies, Eggenstein
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Methyl-H ³ -Thymidin	Amersham, Braunschweig
Mycoplasma Test Kit	Boehringer, Ingelheim
N,N,N',N' Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Okadaic Acid	Calbiochem, Bad Soden
Phosphate Buffered Saline (PBS) Dulbecco's	Life Technologies, Eggenstein
Rainbow Marker, RPN 756	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Life Technologies, Eggenstein
Tween	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn

3.2 Zellkulturmedien und Zusätze

Akt Inhibitor	Calbiochem, Bad Soden
Fötales Kälberserum (FCS)	Hyclone, Logan, UT, USA
Genitacin (G418)	Life Technologies, Eggenstein
Gliotoxin	Calbiochem, Bad Soden
Goe6976	Calbiochem, Bad Soden
Goe6983	Calbiochem, Bad Soden
L-Glutamin	Life Technologies, Eggenstein
Ly 294002	Calbiochem, Bad Soden

MEK-Inhibitor	Promega Corporation, Madison, USA
MG 132	Alexis Biochemicals, Grünberg
Natrium-Pyruvat	Life Technologies, Eggenstein
NF B Aktivations Inhibitor	Calbiochem, Bad Soden
PD 98059	Calbiochem, Bad Soden
RPMI-1640	Life Technologies, Eggenstein
SB 203580	Calbiochem, Bad Soden
SB 238063	Calbiochem, Bad Soden
Sulfasalazin	Calbiochem, Bad Soden
Trypsin 0,05%-EDTA 0,02%	Life Technologies, Eggenstein
Wortmannin	Calbiochem, Bad Soden
zVAD	Promega Corporation, Madison, USA

3.3 Antikörper und rekombinante Proteine

3.3.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Host	Einsatz	Hersteller
Anti-CD95 Klon CH11	Maus (monoklonal)	Zellkultur	Coulter Immunotech, Hamburg
Anti-IL-8	Maus	Zellkultur	RD Systems, Wiesbaden
Anti-I- κ B		EMSA	Santa Cruz Biotechnology
Anti- β -Aktin	Maus (monoklonal)	Western Blot	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Anti-TRAF2	Maus	Western Blot	BD/PharMingen
Anti-uPA	Maus	Zellkultur	American Diagnostica, Greenwich, USA
NOK1		Zellkultur	PharMingen, Hamburg

3.3.2 Sekundäre Antikörper

Anti-Maus-HRP-gekoppelt	Schaf (polyklonal)	Western Blot	Amersham Life Science, Braunschweig
-------------------------	--------------------	--------------	-------------------------------------

3.3.3 Rekombinante Proteine

CD95L	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von H. Wajant, Universität Würzburg
IL-8	R&D Systems, Wiesbaden
TRAIL (Thr-95-Gly-281)	R&D Systems, Wiesbaden
uPA	American Diagnostica

3.4 Labormaterialien

4-20% Tris-Glycine SDS Gel	Life Technologies, Eggenstein
Biomax MR Röntgenfilm	Kodak Eastman, New York, USA
Casy-Zählautomat	Schärfe System, Reutlingen
Curix 60 Entwickler	Agfa, Dübendorf
ELISA-Reader	Anthos, Salzburg, Österreich
Liquid Szintillations Counter	Wallace Oy, Turku, Finnland
PVDF Membran, Immobilon-P	Milipore, Eschborn
Wet Blot Kammer, Mini Trans Blot Cell	Bio Rad Laboratories, München
Zellharvester	Skatron, Lier, Norwegen

3.5 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien entstammen alle menschlichen Pankreastumoren bzw. deren Metastasen. Die Spalte „Referenz“ gibt die Erstveröffentlichungen der jeweiligen Zelllinie an. Die angegebene Charakterisierung ist diesen Arbeiten entnommen.

Zelllinie	Ursprung	Differenzierung	Herkunft	Referenz
Panc1	Pankreasadenokarzinom Primärtumor	Schlecht differenziert, Grad III	ATCC, Rockville, USA	M. Lieber, 1975
Colo357	Pankreasadenokarzinom Lymphknotenmetastase	Gut differenziert Grad II	R. Morgan, Denver, USA	Morgan, 1980
Panc89	Pankreasadenokarzinom Lymphknotenmetastase	Schlecht differenziert, Grad II-III	T. Okabe, Tokyo, Japan	Okabe, 1983
PancTul	Pankreasadenokarzinom Primärtumor	Schlecht differenziert, Grad III	Mainz, Deutschland	M.v. Bülow, 1980

3.6 Zellkultur

3.6.1 Langzeitlagerung der Zellen

Zur dauerhaften Lagerung der verwendeten Zellen, wurden diese in flüssigem Stickstoff bei -196 °C in Lösung mit FCS (fetal calf serum) und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) eingefroren.

3.6.2 Auftauen, Kultivieren und Passagieren von Zellen

Jeweils ein Aliquot von den zu kultivierenden Zellen wurde aus dem flüssigen Stickstoff genommen und bei -80 °C zwischengelagert. Dann wurde es im Wasserbad bei 37 °C vorsichtig aufgetaut. Nach vollständigem Auftauen wurden die Zellen mit Kulturmedium versetzt, für drei Minuten bei 1400 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 15 ml Medium resuspendiert. Danach wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, in 5 ml Medium resuspendiert und auf eine T25 Zellkulturflasche ausgesät. Das für die Zellkultur verwendete Medium war RPMI 1640 Medium versetzt mit 10% FCS, 2 mM Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat.

Die Zellen wurden zum Kultivieren bei 37 °C in einem Begasungs-Brutschrank in 5,0% CO₂-haltiger Luft und Wasserdampf gesättigter Atmosphäre gelagert. Alle für die Experimente verwendeten Zellen wuchsen adhärent und einschichtig in T25, T75 oder T175 Zellkulturflaschen.

Die Zellen wurden täglich mikroskopisch auf Kontaminationen untersucht und zur Beurteilung der Konfluenz begutachtet. Bei einer Zelldichte von 70-90% wurden die Kulturen passagiert und für Versuche oder Fortführung der Kultur verwendet. Um die Zellen von der Flasche abzulösen wurden die Zellen zunächst mit PBS (phosphate buffered saline) gewaschen und danach mit einer Trypsin-Lösung, je nach Zelllinie und deren Ablöseverhalten, für 10 bis 15 min im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden zur Inaktivierung des Trypsins mit Medium versetzt und drei Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in Medium resuspendiert. Zur Fortführung der Zellkultur wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 bis 1:5 (je nach Wachstumsverhalten der Zelllinie und vorheriger Konfluenz) in einer neuen Flasche ausgesät. Falls die Zellen für Versuche verwendet werden sollten, wurden sie zu diesem Zeitpunkt für eine gezielte Aussaat gezählt (3.6.3).

Vierteljährlich und vor jedem Einfrieren neuer Aliquots wurden die Zellen mittels PCR (kommerzieller Mycoplasmen Testkit) auf Kontamination mit Mycoplasmen getestet.

3.6.3 Zählen von Zellen

Zur Bestimmung der Zahl von in Medium suspendierten Zellen wurde ein definierter Teil der von der Kulturflasche abgelösten Zellen zu 5 ml Casy-Zählflüssigkeit hinzupipettiert, durchmischt und im Casy-Zählautomaten gezählt. Für ein genaueres Messergebnis wurde dieser Vorgang wiederholt und aus dem Mittelwert der Zellgehalt pro Mikroliter Suspension berechnet.

3.6.4 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden jeweils 1×10^6 Zellen in sterile 1,8 ml Nunc Röhrchen verteilt und diesen je 1,5 ml FCS, welches mit 10% DMSO vermischt war, hinzugefügt. Vor dem eigentlichen Einfrieren wurden die befüllten Nunc Röhrchen in einem auf 4 °C vorgekühlten Nalgene Einfrierbehälter äquilibriert und darin in einem -80 °C Gefrierschrank eingefroren. Innerhalb der folgenden Woche wurden die Aliquots dann zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.7 Molekularbiologische Routinemethoden

3.7.1 Transfektion

Zur Zelltransfektion wurde das AMAXA Nucleofection KIT verwendet (AMAXA, Köln). 1×10^6 Zellen wurden in der Lösung V resuspendiert und anschließend mit 5 µg des jeweiligen Vektors (TRAF2-pcDNA3 bzw. pcDNA3, BD Biosciences, Heidelberg) vermischt. Die Zellen wurden mittels Elektroporation im AMAXA Nucleofector (Programm T-20) transfiziert.

Für die TRAF-2 –Inhibitionsversuche wurden die Zellen mit 150 nM TRAF2-siRNA (Strang: 5'-AGGGCAUAUAUGAAGAAGGCA-3', Gegenstrang: 3'GCUCCCGUAUAUACUUCUCCGU-5') oder Kontroll-RNA transfiziert. Die siRNA wurde von Ribopharma (Kulmbach) bezogen.

3.7.2 Gewinnung von Proteinen aus Gesamtzelllysaten

Um Gesamtproteine aus Zelllysaten zu gewinnen, wurden nur Zellen verwendet, deren Medium am Vortag gewechselt worden war und die bereits mindestens eine Woche in Kultur waren. Zunächst wurde das Medium der zu lysierenden Zellen abgesaugt und die adhärennten Zellen 1x mit PBS gewaschen, um bereits abgelöste und apoptotisch aufgetrennte Zellanteile zu entfernen. Zur Lyse der Zellen in 6well-Platten wurden die Zellen dann mit 100 µl eiskaltem RIPA-Puffer pro Well für 10 min auf Eis inkubiert. Zur Verbesserung der Lysis-Effizienz wurden die Lysate nun für mindestens 30 min eingefroren. Zur Weiterverarbeitung wurden die Lysate auf Eis langsam wieder aufgetaut, in 1,5 ml Eppendorf Röhrchen überführt und zur Homogenisierung durch eine 26 Gauge Nadel zehn Mal aspiriert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 14000 rpm wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und das Pellet verworfen. Der gewonnene Überstand konnte nun zur Proteinbestimmung oder zur längerfristigen Lagerung bei –20 °C verwendet werden.

Verwendete Puffer und Lösungen:

- RIPA-Puffer: 50 mM Tris-Cl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1% Na-Desoxycholat, 0,1% SDS, eine Complete Tablette (Proteinaseinhibitor-Cocktail, Boehringer) pro 50 ml Puffer.

3.7.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte anhand eines kommerziellen Proteinassays der Firma Pierce nach Angaben des Herstellers.

3.7.4 Protein-Gelelektrophorese

Denaturierende diskontinuierliche Protein-Gelelektrophorese nach Lämmli (1970)

Mittels Western-Blot-Analyse ist es möglich, Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen und so Zellextrakte qualitativ und semiquantitativ zu überprüfen. Dies erfolgte mittels fertiger Gradientengele der Firma Invitrogen. Die zuvor aus RIPA-Lysaten gewonnen Proben wurden mit 4x Lämmli-Puffer versetzt und dann mit RIPA-Puffer plus Complete auf das gleiche Volumen bei gleicher Gesamtproteinmenge gebracht. Dann wurden die Proben bei 95 °C auf dem Schüttler denaturiert, kurz abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Eine Tasche des verwendeten Gels wurde mit maximal 30 µl Gesamtmenge der Probe befüllt. Danach wurden die Proben bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt.

Verwendete Puffer und Lösungen:

- Lämmli-Puffer (4x, pH 6,8): 1,25 ml Tris/HCl (2 M), 8 ml SDS (sodium duodecylsulfate) (10%), 308,5 mg Dithiotreitol (DTT), 2,02 ml Glycerin, 2 mg Bromphenolblau
- Elektrophorese-Laufpuffer (pH 8,3): 25 mM Tris Base, 192 mM Glycin, 0,1% SDS

3.8 Western Blot und Immundetektion

Die Kombination dieser Methoden wurde zur indirekten qualitativen und semiquantitativen Darstellung der elektrophoretisch aufgetrennten zellulären Proteine benutzt.

3.8.1 Western Blot

Für den Transfer der Proteine wurde das Wet-Verfahren unter Benutzung einer Blotting-Kammer (Bio Rad) angewendet. Nach Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld wurde zunächst eine PVDF-Membran in Gelgröße und vier Stück 3MM Whatmann-Filterpapier vorbereitet. Die Membran wurde dafür für 2 min mit Methanol benetzt, dann für 5 min in destilliertem Wasser rehydriert und danach in Blotting-Puffer äquilibriert. Bei der Schichtung des Blots wurde mit der anodenwärts gerichteten Seite eines aufklappbaren Blotting-Kammer-Einsatzes begonnen. Ihm folgte eine Saugmatte, dann zwei Schichten von mit Blotting-Puffer durchtränktem Filterpapier, die PVDF-Membran, das Gel, weitere zwei Schichten Filterpapier, wieder eine Saugmatte und dann wurde der Blotting-Kammer-Einsatz mit der kathodenwärts gerichteten Seite zugeklappt. Nun wurde er in richtiger Orientierung in eine mit Blotting-Puffer gefüllte Blotting-Kammer (Mini Trans Blot Cell, Bio Rad) gesetzt, so

dass der Einsatz vollständig mit Puffer bedeckt war. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte für 1-2 Stunden bei 400 mA in der Eiswanne.

Verwendete Puffer und Lösungen:

- Blotting-Puffer auf Wasserbasis (1000 ml): 12,11 g Tris Base, 14,26 g Glycin und 200 ml Methanol.

3.8.2 Immundetektion

Um unspezifische Bindungsmöglichkeiten für Antikörper abzusättigen, wurde die Membran nach dem Transfer über Nacht bei 4 °C in Blockierungs-Puffer inkubiert. Danach wurde sie für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem jeweiligen primären Antikörper in Antikörperpuffer inkubiert. Die Verdünnung des Antikörpers folgte dabei den Angaben des Herstellers. Nach Inkubation wurde die Membran für 3x15 min mit PBST auf dem Schüttler gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper in Antikörper-Puffer für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der bereits beschriebene Waschvorgang wiederholt. Schließlich wurde die Membran für 5 min mit einem Chemilumineszenz Substrat (ECL™ bzw. ECLplus™) inkubiert, mit Klarsichtfolie luftblasefrei ummantelt und in einer Dunkelkammer einem Röntgenfilm exponiert und dieser entwickelt.

Verwendete Puffer und Lösungen:

- Ein Liter PBS-Lösung (10x) enthält 80 g NaCl, 14,5 g Na₂HPO₄, 2 g KH₂PO₄ und 2 g KCl.
- PBST (1x) enthält PBS (1x) und 0,1% Tween20.
- Der Blockierungs-Puffer enthielt PBST (1x) und 5% Magermilchpulver.
- Antikörper-Puffer enthielt PBST (1x), 0,5% Magermilchpulver und den jeweiligen Antikörper.

3.9 DNA-Fragmentationsassay (Jam-Assay)

Der JAM-Assay wurde zur Quantifizierung der Apoptoserate angewandt. Zu Beginn wurden 0,5-1x10⁴ Zellen (je nach Versuchsreihe) und 10 µl Kulturmedium mit 10% FCS auf einer 96well-Platte ausgesät. Anschließend folgte eine Inkubation der Zellen für 24 Stunden im Brutschrank, um eine Konfluenz von circa 70% zu erreichen. Nun folgte der Einbau radioaktiver Nukleotide in das Genom der Zellen mit dem radioaktiven Marker 3H-Thymidin (50 µl 3H-Thymidin Stocklösung (=50 µCi) auf 950 µl Medium). Pro Well wurden 10 µl des radioaktiven Mediums appliziert und die Platte anschließend für 3 Stunden im Brutschrank

bei 37 °C inkubiert. Danach wurde der radioaktive Überstand von den Zellen entfernt und diese 2x mit PBS gewaschen. Im Folgenden wurden die Zellen mit Apoptose-induzierenden Substanzen wie TRAIL, CH11 bzw. CD95 behandelt und im Brutschrank für weitere 24 Stunden inkubiert. Zur Kontrolle dienten Zellen, die parallel ausschließlich mit 100 µl Medium inkubiert wurden. In Versuchen, in denen die verschiedenen Signalwegketten inhibiert werden sollten, wurden die Zellen mit den entsprechenden Substanzen versetzt. CD95L und TRAIL wurden stets in der Konzentration 100 ng/ml Medium eingesetzt. Beendet wurde der Versuch mit der Lyse der Zellen durch Inkubation mit 100 µl einer 0,1%igen SDS-Lösung, die für 30 min im Brutschrank auf den Zellen verblieb. Die nun vollständig lysierten Zellen wurden mit einem Zell-Harvester über eine Filtermatte gesogen, wobei fragmentierte DNA-Moleküle den Filter passieren konnten, unfragmentierte intakte DNA-Moleküle jedoch in der Filtermatte verblieben. Die Filtermatte wurde nun über Nacht getrocknet und am nächsten Tag mit Scintillationsflüssigkeit geschwemmt und anschließend die eige baute Radioaktivität in der in der Filtermatte befindlichen DNA gemessen.

Die Apoptoserate berechnete sich aus den Ergebnissen wie folgt:

Apoptose in Prozent = $100 - (E/S) \times 100$, wobei E (experimentell) für den DNA-Gehalt (gemessen als cpm: counts per million) Apoptose induzierter Proben steht und S (spontan) den DNA-Gehalt der Zellen, die aufgrund der natürlichen zellspezifischen Apoptoserate zugrunde gegangen sind, darstellt.

3.10 3H-Thymidin-Proliferationsassay

Mit dem 3H-Thymidin Proliferationsassay wird im Gegensatz zum JAM-Assay die Wachstumsrate der Zellen nach Behandlung mit apoptoseinduzierenden Substanzen bestimmt. Hierfür werden die Zellen wie beim JAM-Assay ausgesät und 24 Stunden inkubiert. Dann folgt zunächst für 21 Stunden die Behandlung mit apoptoseinduzierenden Substanzen. Im Anschluss werden die Zellen mit 3H-Thymidin markiert („gelabelt“), indem es zum bereits auf den Zellen befindlichen Medium hinzupipettiert und dort für drei Stunden belassen wird. Danach folgt die Lyse und das Harvesten der Zellen analog zum JAM-Assay.

3.11 Electrophoretic mobility shift assay

Der Electrophoretic mobility shift assay (EMSA), auch Gel Shift Assay genannt, dient zum Auftrennen und Nachweis von an DNA-bindenden Proteinen. Zu diesen Proteinen gehören beispielsweise Transkriptionsfaktoren wie NF-κB und AP1.

Zunächst wuchsen $2-2,7 \times 10^5$ Zellen mit 3 ml RPMI Medium und 10% FCS bis zur Konfluenz auf 6well-Platten. Zur Gewinnung von Zellkernextrakten wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums zunächst 2x mit PBS gewaschen, dann mit 500 µl Extraktionspuffer auf Eis inkubiert. Die gewonnene Suspension wurde für 30 s bei 4 °C zentrifugiert und die dadurch entstandenen Zellkern-Pellets in eiskaltem EMSA-Puffer resuspendiert. Danach wurden die Röhrchen für 15 min auf dem Schüttler inkubiert. Nach einer letzten Zentrifugation bei 4 °C wurden die so gewonnenen Überstände, welche Zellkernproteine enthielten, abpipettiert und bei -80 °C eingefroren.

Die gewonnen Proteine wurden mit radioaktiv markierten DNA-Sequenzen, die entweder eine Bindungsstelle für NF-κB oder AP1 (activating protein 1) trugen, in EMSA-Puffer (Promega, Mannheim) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und mittels Polyacrylamid Gel Elektrophorese bei 100 V und 4 °C getrennt. DNA-Protein-Komplexe wandern hierbei langsamer und liegen höher als ungebundene DNA („shift“). Durch Zugabe von Antikörpern gegen entweder NF-κB oder AP1 entstehen DNA-Protein-Antikörperkomplexe, die eine noch geringere Mobilität aufweisen und entsprechend höher als alle anderen Banden liegen (sog. „supershift“).

Durch Auflegen eines Röntgenfilms können die Banden nach dem Shift- bzw. Supershift-Assay durch die radioaktiv markierte DNA sichtbar gemacht werden. Für den Supershift-Assay wurden entweder 0,4 µg Anti-p65-, 0,4 µg Anti-p50- oder 0,4 µg Anti-I-κBα-Antikörper für eine Stunde bei 4 °C der Probe hinzugefügt.

Für die Stimulations-Assays mit CD95L, wurde den Zellextrakten 10 min vor Inkubation mit gelabelten NF-κB-bindenden Oligonukleotiden, einer 50-fach höhere Konzentration von ungelabelten NF-κB-spezifischen Oligonukleotiden oder einer 100-fach höhere Konzentration an ungelabelten unspezifischen (sogenannten „CREB-binding“) Oligonukleotiden (Promega) hinzugefügt, um nur die NF-κB-Aktivierung nach Stimulation zu detektieren.

3.12 Bestimmung der uPA- und IL8-Konzentration in Zellkulturüberständen

Um Proteinkonzentrationen in Zellkulturüberständen bestimmen zu können, verwendet man in der Regel einen sogenannten „Enzyme Linked Immosorbent Assay“ (ELISA). Es handelt sich um ein immunologisches Nachweisverfahren, welches Konzentrationsbestimmung von Proteinen, Viren, aber auch niedermolekularen Verbindungen, wie zum Beispiel Hormonen und Toxinen, durch Messung einer enzymatischen Farbreaktion bei Antikörperbindung, ermöglicht.

Zur Versuchsvorbereitung wurden die Zellen mit $2,7 \times 10^5$ Zellen/Well in einer 6well-Platte ausgesät und wuchsen über 24 Stunden in Kulturmedium mit 10% FCS adhärent bis zu einer

Konfluenz von circa 70%. Die Zellen wurden dann für weitere 18 Stunden mit CD95L (100ng/ml) inkubiert, welcher direkt dem Medium zugesetzt wurde oder blieben unbehandelt. Um die Caspasenaktivität in den Zellen zu hemmen, wurden die Zellen 30 min vor der Behandlung mit CD95L, mit 50µM zVAD-fmk (Carbobenzoxymethyl-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketon) inkubiert. Zur Messung der uPA (urokinase-type plasminogen activator)- oder IL-8 (Interleukin-8)-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen wurden uPA- (American Diagnostica) oder IL-8-Immunoassays (R&D Systems) entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet. Die Konzentrationen beider Proteine wurden in Verhältnis zur parallel ermittelten Zellzahl gesetzt.

3.13 Invasionsassay

Das invasive Potential der verwendeten Pankreaskarzinomzellreihen wurde mit einem modifizierten Trypan-Blau-gefärbten Modell für Zellinvasion untersucht.

Zunächst wurden Kif5-Fibroblasten auf einer 24well-Platte mit $1,5 \times 10^5$ Zellen/Well in 1ml Medium und 10% FCS ausgesät und wuchsen 3 Tage bis zu einem dichten Fibroblastenrasen mit vollständiger Konfluenz der Zellen. Anschließend wurden die Kulturen 2x mit PBS gewaschen und dann durch eine einstündige Inkubation mit 500 µl DMSO/Well bei Raumtemperatur abgetötet. Danach wurden die Zellen erneut 2x mit PBS und zuletzt 1x mit Medium gewaschen. Nun wurden auf dem Fibroblastenrasen Colo357/VK (Vektorkontrolle) oder Colo357/TRAF2 Zellen in einer Dichte von 2×10^4 Zellen/Well in 1 ml Medium mit 10% FCS ausgesät. Diese wuchsen zunächst für 24 Stunden an und wurden danach für 48 Stunden mit aus Vorversuchen gewonnenen Überständen behandelt. Eine Hälfte der Zellen wuchs unter Überständen von Colo357/VK bzw. Colo357/TRAF2 Zellen, die für 18 Stunden mit CD95L (100 ng/ml) behandelt wurden und denen zur Neutralisierung hinterher NOK-1-Antikörper (4µg/ml) beigelegt wurde. Die andere Hälfte der Zellen wurde mit Überständen von Colo357/VK oder Colo357/TRAF2 Zellen versetzt, die ebenfalls 18 Stunden in unbehandeltem Kulturmedium wuchsen. Mediumwechsel erfolgte nach 24 Stunden. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen, danach für 15 min mit 0,2% Trypan Blau/PBS (Invitrogen) gefärbt, erneut mit PBS gewaschen und schließlich fotografiert.

3.14 Real-time RT-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine in vitro Methode zur Anreicherung großer Mengen spezifischer DNA-Fragmente mit definierter Länge und Sequenz aus einer kleinen

Menge eines komplexen Gemisches. Die gewünschte DNA-Sequenz wird zunächst durch Erhitzen denaturiert und dann mit Hilfe von Primern, Desoxyribonukleotiden und einer DNA-Polymerase enzymatisch kopiert.

Um eine Aussage über die Transkription eines Gens treffen zu können, ist die Bestimmung der mRNA notwendig. Im Rahmen der klassischen PCR kommen DNA-abhängige Polymerasen zum Einsatz, die nicht in der Lage sind RNA zu amplifizieren. Dementsprechend ist der Zwischenschritt über eine sog. *reverse Transkriptase* notwendig, die RNA in DNA umschreiben kann. Die gewonnene DNA kann dann als Ausgangsmaterial für eine klassische PCR dienen.

In dieser Arbeit wurde die gesamte zelluläre RNA mittels RNA-pure isoliert. Zur Synthetisierung von cDNA wurde ein Gemisch von Hexamerprimern und SuperScriptII von Invitrogen verwendet. Durchgeführt wurde die Real-Time RT-PCR in einem Lightcycler mit Hilfe des LC FastStart DNA Master SYBR GreenI-Kit. Die Primer waren für uPA: Strang 5'-ACA-CGCAAGGGGAGATGAAGTTT-3' und Gegenstrang 5'-TCGAGGGCAGGCAGATGGT-3'; für IL-8: Strang 5'-AAGAAACCACCGGAAGGAACC-3' und Gegenstrang 5'-GTGTTGGC-GCAGTGTGGTC-3. Der Strang für das „Housekeeping Gen“ PBGD war 5'-TCCCGCATCTGGAGTTC-AGGA-3' und der Gegenstrang 5'-CTGGCCACAGCATACATGCA-3'. Die einzelnen PCR-Zyklen waren für jeweils 10 Sekunden pro Zyklus bei 94°C, 58 °C und 72 °C. Die Vermehrung genomischer DNA wurde durch die Messung von Kontrollen ohne reverse Transkription ausgeschlossen. Mittels Schmelzkurvenanalyse wurden unspezifische Amplifikationsprodukte identifiziert beziehungsweise ausgeschlossen. Zur Kalibrierung des Assays wurde eine Kalibrierungs-cDNA über fünf logarithmische Steps seriell verdünnt und parallel amplifiziert.

Für jede Probe wurden die uPA- und IL-8 CT(cycle threshold)-Werte ermittelt. Die Normalisierung erfolgte mit Hilfe der für das „Housekeeping-Gen“ PBGD parallel ermittelten CT-Werte. Die relative mRNA-Expression in den jeweiligen Proben wurde unter Zuhilfenahme der Kalibrierungskurve mittels linearer Regressionsanalyse ermittelt. Die Ergebnisse sind als prozentualer Anteil der mRNA-Expression in unbehandelten Colo357/VK Zellen angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 TRAF2 wird in Pankreaskarzinomen und in Pankreaskarzinom-Zelllinien überexprimiert

Kürzlich wurde von der Arbeitsgruppe von Fr. PD Dr. Trauzold (Sektion Molekulare Onkologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) das Expressionsmuster verschiedener Gene untersucht, die eine Rolle im Rahmen von Apoptoseprozessen spielen. Es konnte nachgewiesen werden, dass Todesrezeptoren, Caspasen und am mitochondrialen Signalweg beteiligte Proteine sowohl in Apoptose-sensitiven als auch Apoptose-resistenten Pankreaskarzinomzelllinien vorhanden sind [57]. In Vorversuchen der Arbeitsgruppe konnte durch immunhistochemische Färbung gezeigt werden, dass die TRAF2-Expression in 30 von 36 untersuchten Präparaten von Pankreaskarzinomen im Vergleich zum gesunden duktalem Pankreasgewebe stark erhöht und in vier weiteren Präparaten leicht erhöht war. Lediglich zwei Tumorpräparate zeigten keine Änderung der TRAF2-Expression an [56]. Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe im Vorfeld dieser Dissertation in den Apoptose-resistenten Zelllinien PancTul, Panc89 und Panc1, im Vergleich zu Apoptose-sensitiven Colo357 Zellen, eine erhöhte TRAF2-Expression mittels Western Blot Analyse nachweisen (Abbildung 1) [56]. TRAF2 könnte folglich eine wichtige Rolle für die Apoptose-Resistenz von Pankreaskarzinomzellen spielen. Die folgende Abbildung stammt aus der oben zitierten Arbeit, in der auch Teile der vorliegenden Dissertation veröffentlicht sind.

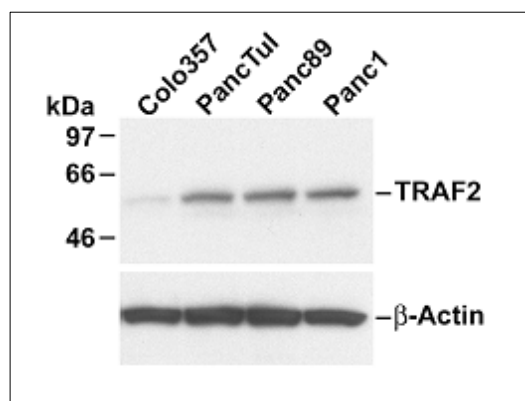


Abbildung 1: TRAF2-Expression der einzelnen Pankreaskarzinom-Zelllinien

Die Western-Blot Analyse wurde mit Hilfe von TRAF2-Antikörpern durchgeführt. Gleichmäßige Gelbeladung wurde durch β -Actin Bestimmung sichergestellt. Aus Trauzold et. al. in FASEB J, 2005 Apr;19(6):620-2.

4.2 Regulation der TRAF2-Expression in Pankreaskarzinomzellen

Es ist bekannt, dass in Pankreaskarzinomen unter Anderem die NF- κ B, PKC- und MEK-Signalwege stark aktiviert sind [37].

Daher wurde die Beteiligung dieser Signalwege an der TRAF2-Expression bestimmt, indem die Zellen mit Inhibitoren verschiedener Signalwege inkubiert wurden. Anschließend wurde die TRAF2-Expression mittels Western Blot Analyse überprüft.

Die Abbildung 2 zeigt, dass in Colo357, Panc1 und Panc89 Zellen vor Allem durch den Proteasomen-Inhibitor MG132, welcher die proteasomale I- κ B-Spaltung und somit die NF- κ B-Aktivierung vermindern kann, die TRAF2-Expression deutlich abnahm. Für Sulfasalazin, welches in seiner aktiven Form die NF- κ B-Komponente p65 phosphoryliert und so die NF- κ B-Aktivität vermindert und Gliotoxin, ein Mykotoxin, welches durch Proteasom-Inhibition ebenfalls die NF- κ B-Aktivität reduziert, ließen sich in Panc1 Zellen ähnliche Ergebnisse erzielen. Ebenfalls reagierten PancTul Zellen mit einer Abnahme der TRAF2-Expression bei Behandlung mit Gliotoxin. In den anderen untersuchten Zelllinien ließen sich keine Veränderungen der TRAF2-Expression beobachten.

Die Inhibition des MEK-Signalwegs durch UO126 resultierte in einer reduzierten TRAF2-Expression in Panc89 und Colo357 Zellen. In Panc1 Zellen dagegen änderte sich die TRAF2-Expression nach MEK-Inhibition nicht und in PancTul Zellen nur kaum.

Auch Inkubation mit PD98059, einem MEK1-Inhibitor oder SB20358 beziehungsweise SB238063, Inhibitoren der p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), führten zu keiner Veränderung der TRAF2-Expression in den untersuchten Zelllinien.

Eine Hemmung der PKC-Aktivität mittels Goe6983 hatte weder in einer Konzentration (100 nM), welche die klassischen und „neuen“ PKCs hemmen sollte noch in einer Konzentration (20 μ M), welche auch PKD1/PKC μ blockiert, einen Einfluss auf die TRAF2-Expression. Ebenfalls ergaben sich keine Änderungen der TRAF2-Level bei Hemmung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) durch Wortmanin oder LY294002 oder nach Einsatz eines AKT-Inhibitors.

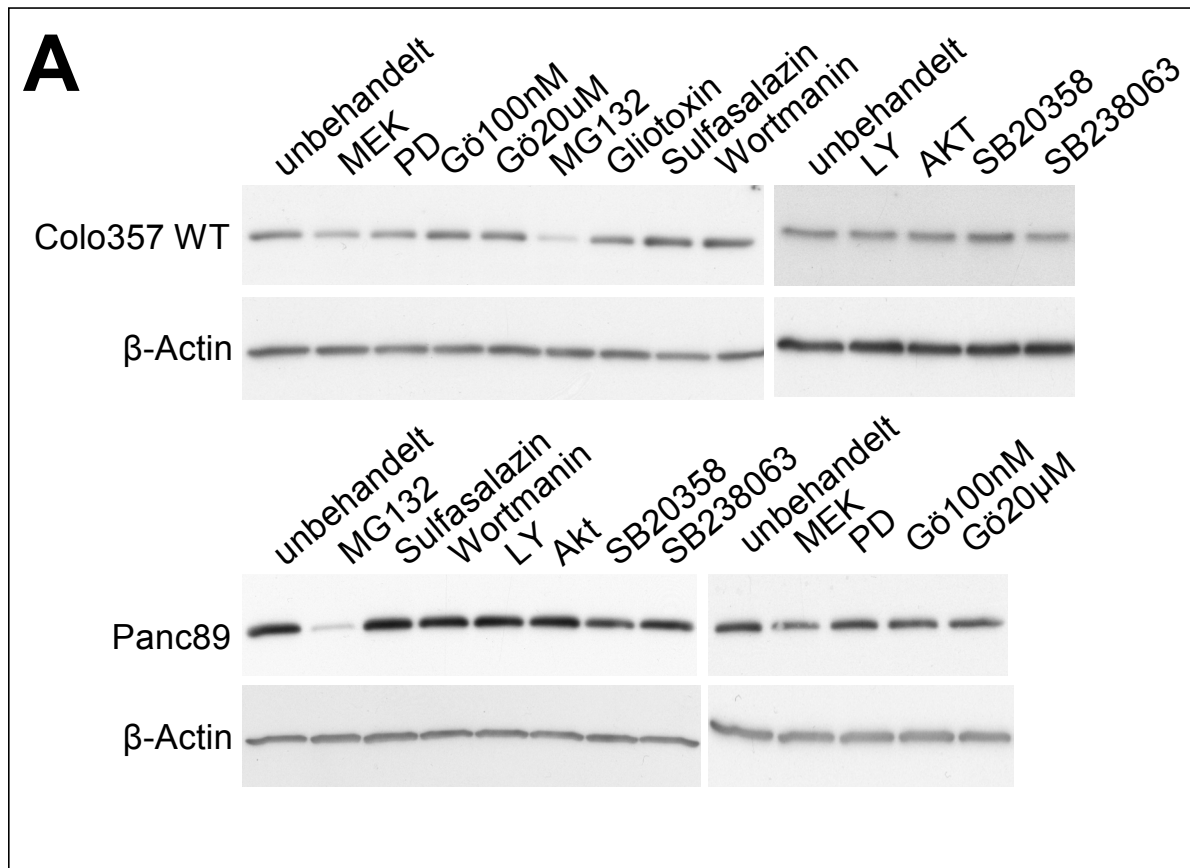


Abbildung 2 A: Regulation der TRAF2-Expression in Colo357/WT und Panc89 Zellen

Die Zellen wurden mit $1,5 \times 10^5$ in 6-well Platten ausgesät und in RPMI Medium mit 10% FCS inkubiert. 24 Std später wurden die Zellen mit MEK-Inhibitor (10 μ M), PD 98059 (50 μ M), Gö6983(100nM), Gö6983(20 μ M), MG132 (2 μ M), Gliotoxin (1mM), Sulfasalazin (1mM), Wortmanin (1mM), LY294002 (20 μ M), Akt-Inhibitor (10 μ M), SB20358 (10 μ M) und SB238063 (10 μ M) für weitere 36 Std. inkubiert oder blieben unbehandelt. Die Western-Blot Analyse wurde mit Hilfe von TRAF2-Antikörpern durchgeführt. Gleichmäßige Gelbeladung wurde durch β -Actin Bestimmung sichergestellt.

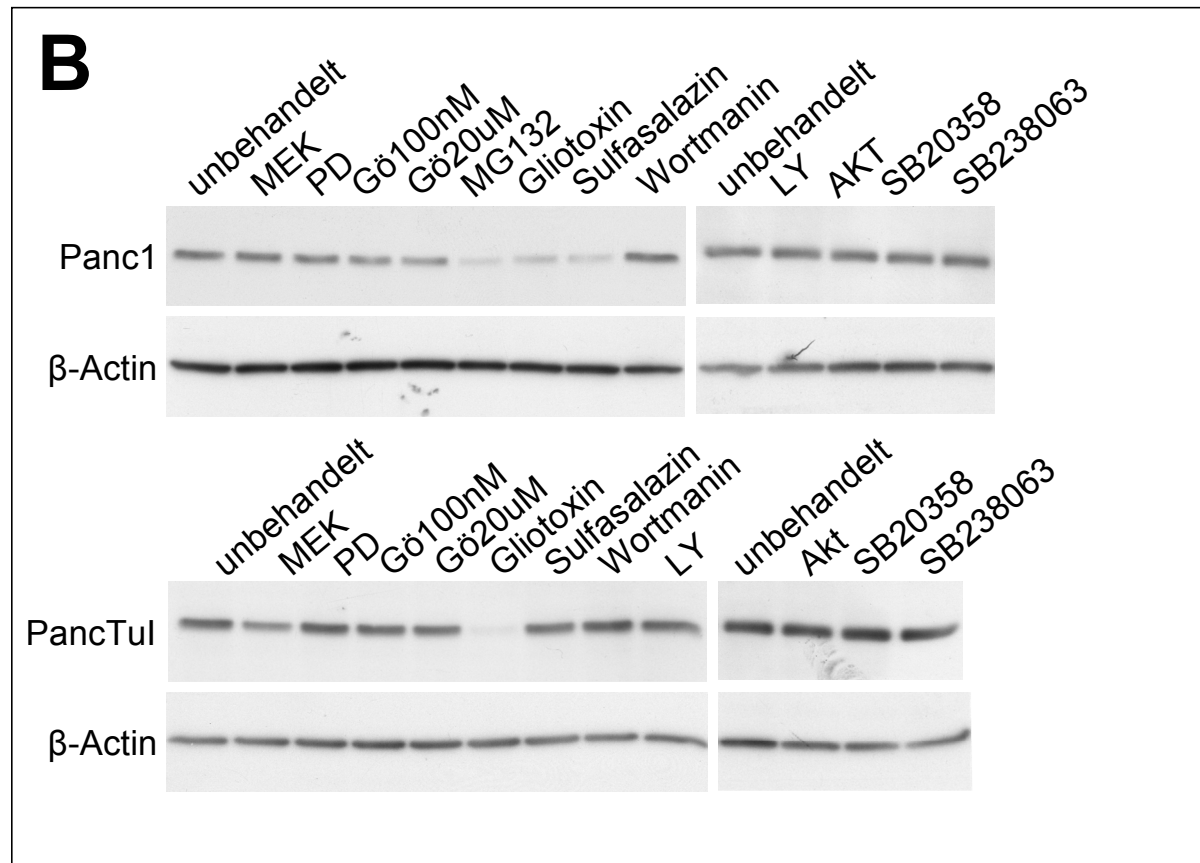


Abbildung 2 B: Regulation der TRAF2-Expression in Panc1 und PancTul Zellen

Die Zellen wurden mit $1,5 \times 10^5$ in 6-well Platten ausgesät und in RPMI Medium mit 10% FCS inkubiert. 24 Std später wurden die Zellen mit MEK-Inhibitor (10 μ M), PD 98059 (50 μ M), Gö6983(100nM), Gö6983(20 μ M), MG132 (2 μ M), Gliotoxin (1mM), Sulfasalazin (1mM), Wortmanin (1mM), LY294002 (20 μ M), Akt-Inhibitor (10 μ M), SB20358 (10 μ M) und SB238063 (10 μ M) für weitere 36 Std. inkubiert oder blieben unbehandelt. Die Western-Blot Analyse wurde mit Hilfe von TRAF2-Antikörpern durchgeführt. Gleichmäßige Gelbeladung wurde durch β -Actin Bestimmung sichergestellt.

4.3 Generierung einer stabilen Colo357/TRAF2 Zelllinie

Um zu untersuchen, welche Rolle TRAF2 in der CD95-vermittelten Apoptose in Pankreaskarzinomzellen spielt, war es wichtig, Zellen vergleichen zu können, die zwar grundsätzlich in ihrer Genstruktur gleich sind, allerdings verschiedene Mengen an TRAF2 exprimieren. Daher wurden Colo357 Zellen, die normalerweise niedrige TRAF2-Level besitzen, mit einem Leervektor (VK, Vektorkontrolle) oder mit Plasmiden transfiziert, welche die Erbinformation für TRAF2 trugen.

Der TRAF2-F-Klon mit der höchsten TRAF2-Expression (Colo357 TRAF2-F (Abbildung 3)) wurde für alle weiteren Versuche verwendet.

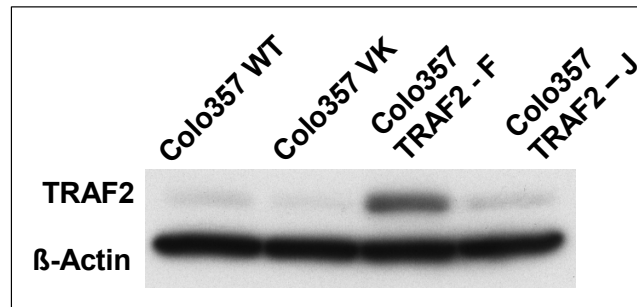


Abbildung 3: TRAF2-Expression der Klone nach Transfektion

Die Western Blot Analyse wurde mit Hilfe von TRAF2-Antikörpern durchgeführt. Gleichmäßige Gelbeladung wurde durch β -Actin-Bestimmung sichergestellt. Die Abbildung zeigt von links nach rechts den Colo357 Wildtyp (WT), der nicht transfiziert wurde, dann die Vektorkontrolle (VK) und rechts sind die beiden Klone TRAF2-F, der für alle weiteren Versuche verwendet wurde und ein weiterer Klon (TRAF2-J), der nur wenig mehr TRAF2 als die Vektorkontrolle exprimierte, dargestellt.

4.4 TRAF2-vermittelte Apoptose-Resistenz

Bekannt ist, dass TRAF2 den TNF-R1-induzierten Zelltod hemmt [55]. Von den untersuchten Tumorzelllinien zeigten die resistenten Zelllinien Panc1, Panc89 und PancTul deutlich höhere TRAF2-Expressionslevel, als die sensiblen Colo357 Zellen (Abbildung 1). Demzufolge wurde geprüft, ob eine erhöhte TRAF2-Expression für die Apoptoseresistenz verantwortlich ist. Hierzu wurde CD95- und TRAIL-vermittelter Zelltod untersucht. Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse eines JAM-Assays. Es wird deutlich, dass eine erhöhte TRAF2-Expression die Apoptoserate von Colo357/TRAF2 Zellen bei Stimulation mit einem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH11 sowie mit dem CD95L und TRAIL, im Vergleich zur Vektorkontrolle und dem Wildtyp, deutlich verringerte.

Bei Behandlung mit Gemcitabin, einem Zytostatikum aus der Gruppe der Antimetabolite, war kein nennenswerter Unterschied festzustellen.

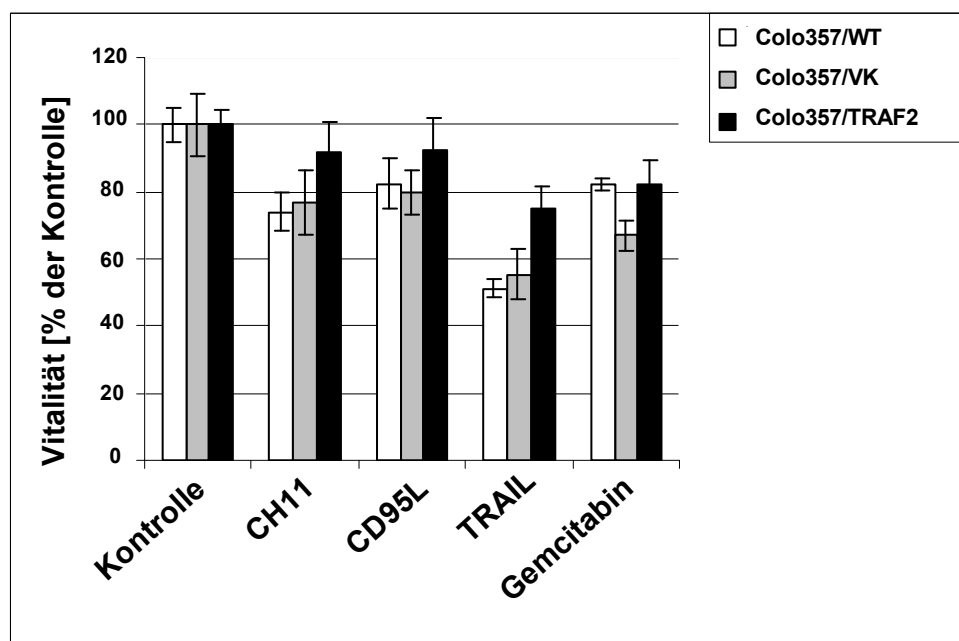


Abbildung 4: TRAF2-vermittelte Apoptoseresistenz

Der JAM-Assay wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden hierbei mit 1×10^4 /Well ausgesät und mit CH11 (100 ng/ml), CD95L (200 ng/ml), TRAIL (100 ng/ml) und Gemcitabin (10 μ g/ml) für 24 Stunden behandelt.

4.5 Überexpression von TRAF2 erhöht das invasive Potential der Tumorzellen

Zusätzlich zur Apoptoseresistenz zeichnen sich Pankreaskarzinomzellen häufig durch hohe Invasivität und hohes Metastasierungspotential aus. Diese Eigenschaft ist auf die vermehrte Expression proteolytischer Enzyme wie Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (uPA) zurückzuführen [58, 59]. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde untersucht, ob die Überexpression von TRAF2 zu einer erhöhten Sezernierung von proteolytischen Enzymen, hier im Speziellen von uPA, führen kann.

Des Weiteren wurde die Sezernierung von IL-8, einem Zytokin, welches mit einer Steigerung des invasiven Potentials von Pankreaskarzinomzellen in Verbindung gebracht wurde [60], gemessen.

Mittels ELISA konnte demonstriert werden, dass die uPA-Konzentration in Überständen von Colo357/TRAF2 Zellen im Vergleich zur Vektorkontrolle etwa 5-fach gesteigert war. Die IL-8-Konzentration fand sich um den Faktor 1,6 erhöht (Abbildung 5).

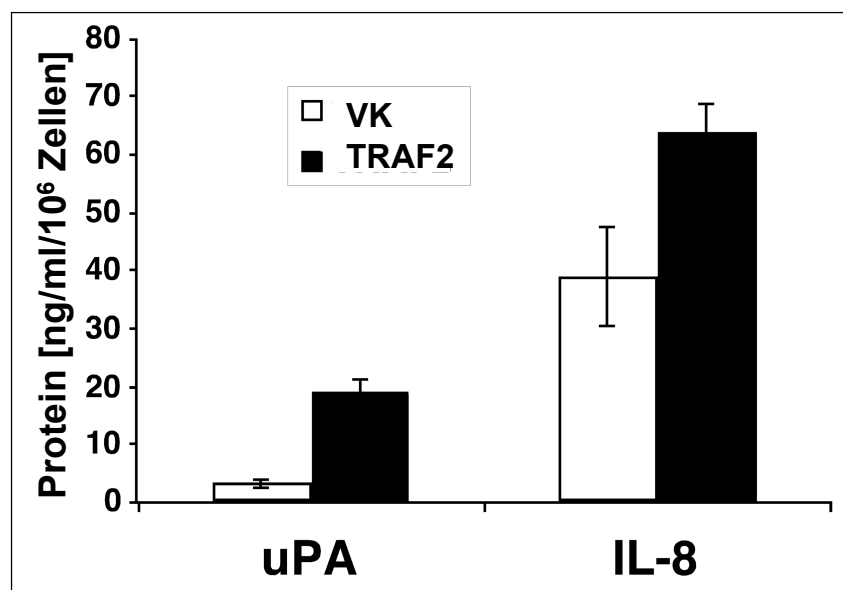


Abbildung 5: Bestimmung von Invasivitäts-fördernden Proteinen in Zellkultur-Überständen von TRAF2 überexprimierenden Colo357 Zellen

Die uPA- und IL-8-Level wurden mittels Immunoassays für das jeweilige Protein bestimmt. Die Konzentrationen wurden zu den Zellen, die parallel zum Assay gezählt wurden, in Verhältnis gesetzt. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Versuchen. TRAF2 steht für Colo357/TRAF2 Zellen, VK für Colo357/VK Zellen

Die Versuche aus Abbildung 5 geben Anlass zu der Annahme, dass es sich bei TRAF2 um ein Schlüsselprotein in der Expressionssteigerung von uPA handelt.

Zum Nachweis, dass eine Abnahme der TRAF2-Level die Expression dieses proteolytischen Proteins senkt, wurden die Colo357/TRAF2 Zellen mit TRAF2-spezifischer siRNA transfiziert und nachfolgend die Sezernierung von uPA mittels ELISA gemessen.

Abbildung 6 zeigt, dass eine Hemmung der Expression von TRAF2 zur deutlichen Reduktion der Menge an uPA im Zellkulturüberstand von Colo357/TRAF2 Zellen führte. Im oberen Teil der Abbildung 6 ist die dazugehörige Western Blot Analyse dargestellt, welche die reduzierte TRAF2-Expression nach Transfektion mit TRAF2-siRNA abbildet.

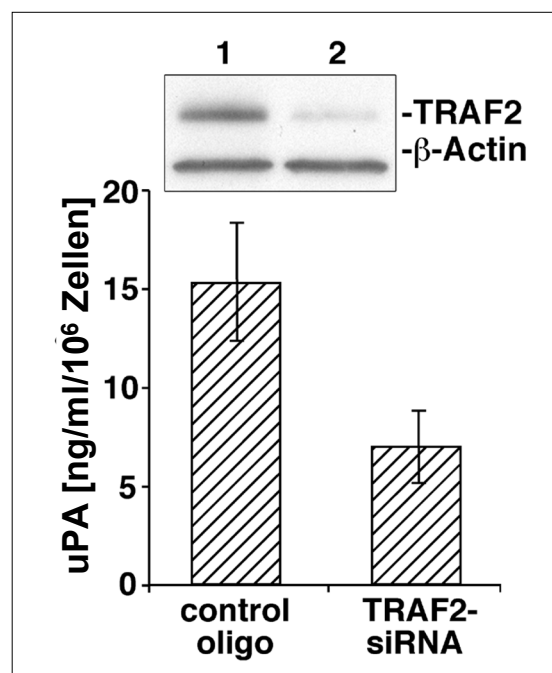


Abbildung 6: Reversion der uPA-Sezernierung von Colo357/TRAF2 Zellen nach Transfektion mit TRAF2-spezifischer siRNA

Die uPA-Level wurden mittels ELISA bestimmt. Die Konzentrationen wurden zu den Zellen, die parallel zum Assay gezählt wurden, in Verhältnis gesetzt. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Versuchen. Im oberen Teil der Abbildung ist die TRAF2-Expression mittels Western Blot Analyse dargestellt. (1 = Colo357/TRAF2; 2 = Colo357/TRAF2 und siRNA)

4.6 CD95-Stimulation steigert das invasive Potential von Pankreaskarzinomzellen

4.6.1 Bestimmung der NF- κ B- und AP-1-Aktivierung bei CD95-Stimulation mittels EMSA

Es ist bekannt, dass Stimulation des CD95-Rezeptors in PancTul Zellen zur Aktivierung von NF- κ B führt [37]. Mittels EMSA wurde in der vorliegenden Arbeit die CD95-induzierte NF- κ B-Aktivierung durch Bestimmung der aktiven NF- κ B-Formen p65/p50 und p50/p50 in TRAF2-überexprimierenden Colo357 Zellen im Vergleich zur Vektorkontrolle untersucht.

Dabei wurden zunächst unbehandelte Zellen analysiert und anschließend Zellen, die jeweils eine halbe Stunde, eine Stunde, drei Stunden und fünf Stunden zuvor mit CD95L behandelt wurden. Aus Abbildung 7 geht hervor, dass eine CD95-Stimulation sowohl bei den mit der Vektorkontrolle transfizierten Colo357 Zellen als auch bei den TRAF2 Zellen (vor allem eine bis drei Stunden) nach der Behandlung zu einer gesteigerten NF- κ B-Aktivität führte.

Außerdem bestand in unbehandelten Colo357/TRAF2 Zellen zusätzlich eine deutlich erhöhte konstitutive Aktivität von NF- κ B. Im Vergleich zu den nicht transfizierten Colo357 Zellen war auch die Steigerung der NF κ B-Aktivität nach Stimulation in Colo357/TRAF2 Zellen deutlich stärker ausgeprägt. Für den proliferationsfördernden Transkriptionsfaktor AP-1 (activating protein 1) ließen sich ähnliche Ergebnisse nachweisen.

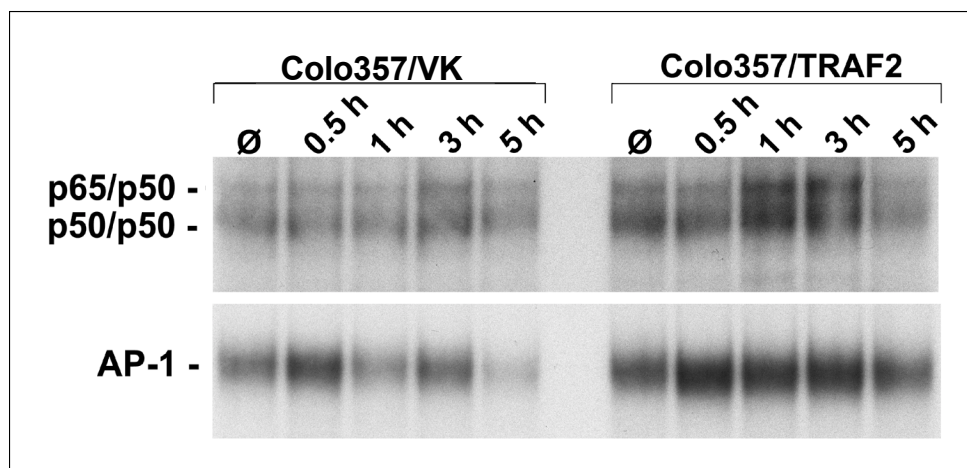


Abbildung 7: TRAF2-Überexpression steigert die NF κ B- und AP1-Aktivität

Mittels EMSA ist die Stimulation der NF- κ B- (oben) und AP-1 (unten) -Aktivität bei Behandlung von Colo357/VK und Colo357/TRAF2 Zellen mit CD95L dargestellt. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 100 ng/ml mit CD95L behandelt. „Ø“ bedeutet keine Behandlung. Die Kernextrakte wurden vorbereitet und analysiert, um die Bindungsaktivität von entweder 32 P-markierten NF- κ B- oder 32 P-markierten AP-1-bindenden Oligonukleotiden mittels EMSA darzustellen. „P65/p50“ und „p50/p50“ bezeichnen die untersuchten Dimere von NF- κ B.

4.6.2 CD95-Stimulation steigert die Expression und Sezernierung von uPA und IL-8

Es ist bekannt, dass die Expression von uPA und IL-8 beträchtlich durch NF- κ B und AP-1 reguliert wird [61-63]. Da es in Colo357/TRAF2 Zellen im Vergleich zur Vektorkontrolle nach Stimulation mit CD95L zu einer deutlich erhöhten NF- κ B- und AP-1-Aktivität kam (Abbildung 7), wurde nun untersucht, ob es nach Stimulation der Zellen mit CD95L ebenfalls zu einer Steigerung der uPA – und IL-8-Expression und -Sekretion kommt.

Mittels RT-PCR Analyse ließ sich zeigen, dass es fünf Stunden nach CD95L-Behandlung in Colo357/TRAF2 Zellen zu einer ausgeprägten Zunahme der IL-8- und uPA-Transkripte kam. Zwar war in den Colo357/VK Zellen auch eine Stimulations-abhängige Zunahme der mRNA für uPA und IL-8 zu beobachten, diese war jedoch im Vergleich zu den Colo357/TRAF2 Zellen deutlich geringer ausgeprägt. Um beurteilen zu können, ob die Steigerung der Expression von uPA und IL-8 von Caspasenaktivität abhängig ist, wurden die Zellen in einer weiteren Versuchsreihe zusätzlich zur Behandlung mit CD95L mit dem Caspaseninhibitor zVAD inkubiert. ZVAD ist ein Zellmembran-permeabler pan-Caspasen-Inhibitor, der irreversibel an die katalytische Seite von Caspasen bindet.

Abbildung 8 zeigt, dass die Behandlung der Zellen mit CD95L und zVAD, die Expression von IL-8 auf etwa die Hälfte reduzierte, die uPA-Expression hingegen leicht zunahm.

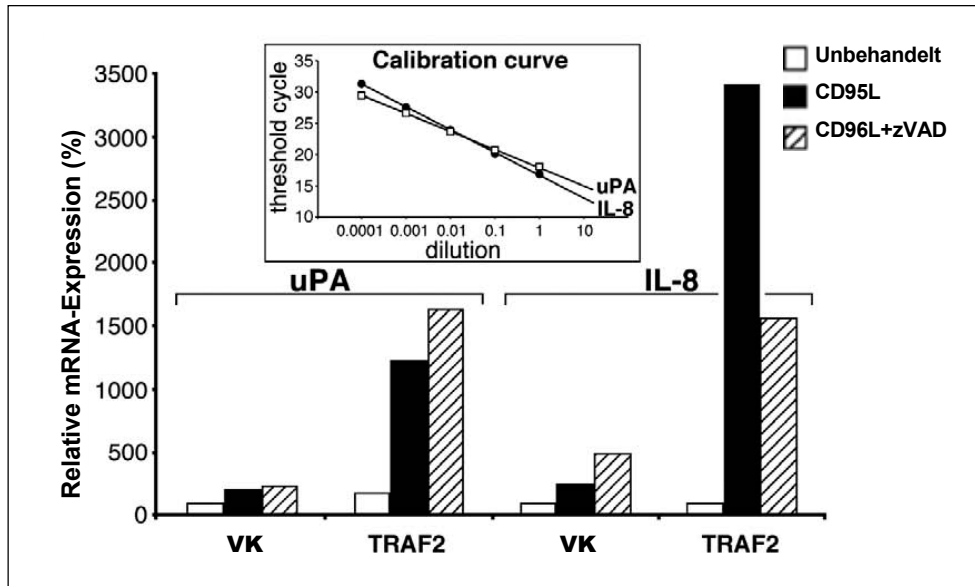


Abbildung 8: TRAF2-Überexpression steigert die Transkription von uPA und IL-8

Mittels quantitativer real-time RT-PCR-Analyse mit spezifischen Primern für IL-8 und uPA wurde die relative mRNA-Expression der Zellen bestimmt. Colo357/Vektorkontrolle Zellen (VK) und Colo357/TRAF2 Zellen (TRAF2) wurden mit einer Dichte von $2,7 \times 10^5$ Zellen/Well in 3 ml Kulturmedium in 6-Well-Platten ausgesät. Nach 24 Stunden (Zeitpunkt 0) wurden alle Zellen mit 1 ml Medium inkubiert, welches entweder CD95L (100 ng/ml), CD95L (100 ng/ml) + zVAD (50 μ M) enthielt oder unbehandelt blieb. Nach 5 Stunden Behandlung wurde die RNA gewonnen. Oben wird die Linearität der Kalibrationskurve gezeigt. Die Expression wird angegeben in Prozent der jeweiligen unbehandelten Kontrollzellen (VK).

Zusätzlich zur real-time RT-PCR wurde die IL-8- und uPA-Konzentration mittels ELISA in Zellkulturüberständen von Colo357/VK und Colo357/TRAF2 Zellen bestimmt, nachdem diese für 18 Stunden mit CD95L inkubiert wurden. Aus Abbildung 9 ist zu entnehmen, dass eine CD95-Stimulation in beiden Zelllinien, den Colo357/TRAF2 Zellen und den Colo357/VK Zellen, eine IL-8 und uPA-Sezernierung anregte. Diese Effekte waren in den mit TRAF2-transfizierten Zellen eindrucksvoller. Wurden die Zellen zusätzlich mit zVAD inkubiert, fand sich die Sezernierung von IL-8 um etwa die Hälfte vermindert. Kotroverse Ergebnisse zeigten sich bei Inkubation mit zVAD für uPA. Trotz gesteigerter uPA Transkription, nahm die Sezernierung dieses Enzyms ab.

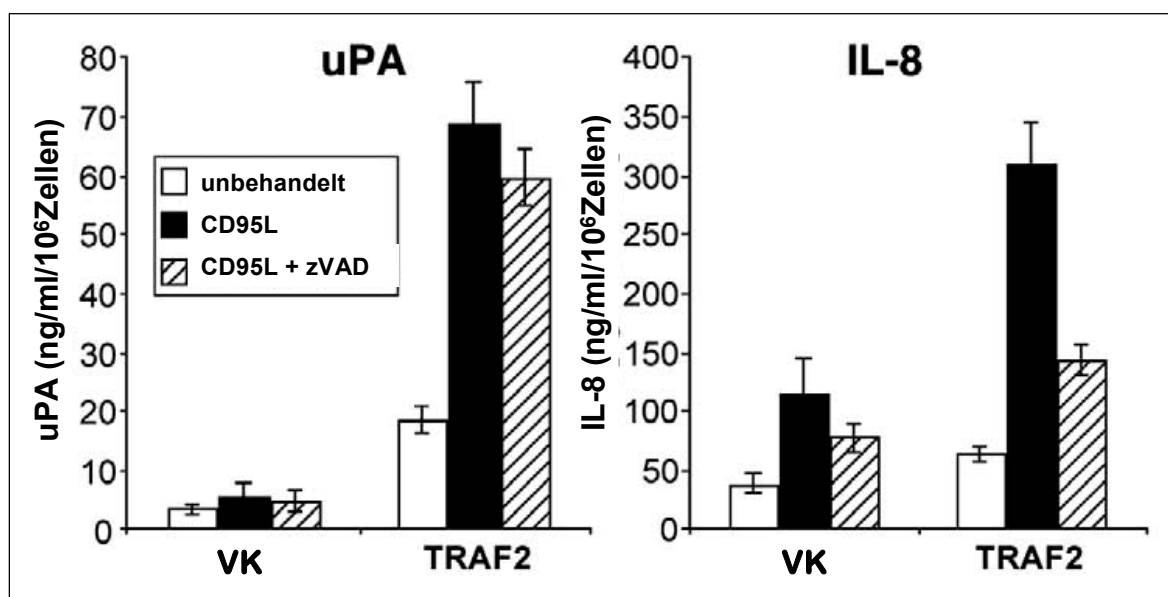


Abbildung 9: TRAF2-Überexpression steigert die Sezernierung von uPA und IL-8

Die IL-8- und uPA-Sezernierung wurde mittels ELISA bestimmt. Die Konzentrationen der beiden Proteine wurden zu der Zellzahl, die parallel dazu zum Zeitpunkt Null bestimmt wurde, in Verhältnis gesetzt. Genauso wie zur real time RT-PCR-Analyse wurden $2,7 \times 10^5$ Zellen/Well in 3 ml Kulturmedium in 6-Well-Platten ausgesät. Ebenfalls nach 24h (Zeitpunkt Null) wurden alle Zellen mit 1 ml Medium inkubiert, welches entweder CD95L (100 ng/ml), CD95L (100 ng/ml) + zVAD (50 μ M) enthielt oder unbehandelt blieb. Nach 18h Behandlung wurden die Überstände gewonnen und zur Untersuchung abzentrifugiert.

4.7 Demonstration der Invasivitätssteigerung von Colo357/TRAF2 Zellen durch CD95-Stimulation anhand eines Invasionsassays

Da die Überexpression von TRAF2 die Resistenz der Zellen gegenüber CD95-vermitteltem Zelltod bedingt und zusätzlich eine Erhöhung von CD95-vermittelter Sezernierung von uPA und IL8 hervorruft, wurde postuliert, dass TRAF2 eine CD95L-induzierte Invasionssteigerung der Pankreaskarzinomzellen hervorrufen kann. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein Invasionsassay durchgeführt. Hierbei wurden die Karzinomzellen auf einem konfluenten Rasen von abgetöteten Fibroblasten ausgesät und wuchsen zunächst über 24h fest. Danach wurden sie für weitere 48h behandelt. Die Colo357 bzw. Colo357/TRAF2 Zellen wurden mit Überständen von Zellen inkubiert, die entweder mit CD95L behandelt wurden oder unbehandelt blieben. Teil „A“ der Abbildung 10 zeigt Colo357/VK Zellen, die mit unbehandeltem Überstand von Colo357/VK Zellen inkubiert wurden. Teil „B“ ist ein reiner Fibroblastenrasen, Teil „C“ zeigt Colo357/VK Zellen, die mit Überstand von unbehandelten Colo357/TRAF2 Zellen versetzt wurden, Teil „D“ die gleichen Zellen, die allerdings mit Überstand von mit CD95L inkubierten Zellen behandelt wurden. Teil „E“ zeigt ein Foto von Colo357/TRAF2 Zellen, die mit unbehandeltem Überstand der gleichen Zellen inkubiert wurden und Teil „F“ stellt ebenfalls Colo357/TRAF2 Zellen dar, diese wurden jedoch mit Überstand von mit CD95L stimulierten Colo357/TRAF2 Zellen inkubiert. Die Abbildung 10 zeigt, dass das invasive Potential von Colo357/VK Zellen eindeutig gesteigert wurde, wenn diese mit Überständen von Colo357/TRAF2 Zellen inkubiert wurden (vgl. „A“ und „C“). Im Vergleich dazu hob eine zusätzliche Stimulation der Colo357/TRAF2 Zellen mit CD95L das invasive Potential dieser Zellen nicht noch weiter an (vgl. „C“ und „D“). Wurden die Colo357/TRAF2 Zellen mit Überständen von Colo357/TRAF2 Zellen inkubiert, die mit CD95L behandelt wurden, so wurde deren Invasivität nochmals deutlich gesteigert (siehe „F“). Eine Inkubation von Colo357/TRAF2 Zellen mit Überständen von Colo357/TRAF2 Zellen, die unbehandelt blieben, steigerte das invasive Potential der Zellen weniger ausgeprägt (vgl. „E“ und „F“). Diese beobachtete Invasivitätssteigerung aufgrund der Sezernierung proteolytischer Enzyme stützt die vorher erlangten Ergebnisse auch im Zellkulturmodell. Die Stimulation des CD95 Rezeptors führt bei den untersuchten Zellen aufgrund der TRAF2-Überexpression nicht zum Zelltod, sondern zu einer Steigerung des invasiven Potentials dieser Tumorzellen.

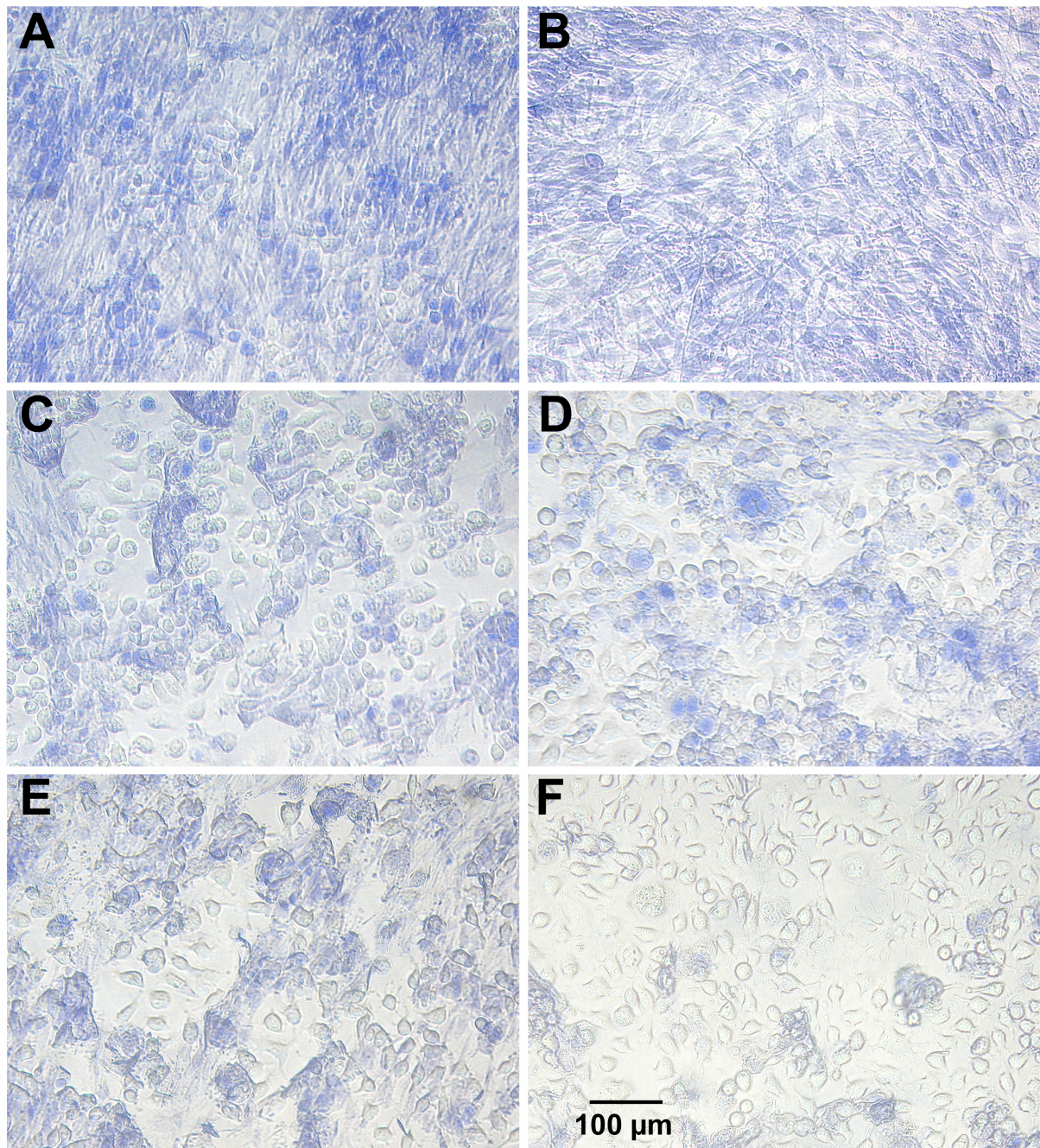


Abbildung 10: TRAF2 vermittelt die CD95-induzierte Invasivität von Colo357/TRAF2 Zellen

Kif5 Fibroblasten wurden mit einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen in einer 24-Well-Platte ausgesät, wuchsen dann für drei Tage, bis ein dichter Fibroblastenrasen entstand und wurden danach mit DMSO getötet. Anschließend wurden Colo357/VK bzw. Colo357/TRAF2 Zellen mit 2×10^4 Zellen/Well auf dem Rasen ausgesät und wuchsen für 24 Std. an. Danach wurde das Medium mit aus Vorversuchen gewonnen Überständen von Colo357/VK bzw. Colo357/TRAF2 Zellen ersetzt, die entweder unbehandelt waren oder für 18 Std. mit CD95L inkubiert wurden. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen, dann mit Trvoan Blau eingefärbt und hinterher fotoarafiert.

5 Diskussion

5.1 TRAF2 als Schlüsselprotein der Apoptose-Resistenz von Pankreaskarzinomzellen

Mechanismen, die eine gesteigerte Apoptoseresistenz vermitteln, wurden in der Vergangenheit in der Sektion Molekulare Onkologie des UKSH, Campus Kiel bereits intensiv untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es eine Vielzahl von Mechanismen gibt, die ein gesteigertes Zellüberleben vermitteln [35, 37, 57, 64, 65]. Hierzu zählt zum Beispiel die Überexpression verschiedener antiapoptischer Proteine, wie Mitgliedern der Bcl-2 Familie, PKC μ /PKD1, FAP-1, XIAP oder die verminderte Expression proapoptotischer Proteine, wie Bid oder FADD. Auch die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, kann die Zelle vor Apoptose schützen. Im Rahmen einer Vielzahl von Studien zeigte sich, dass Zellen häufig mehrere protektiven Mechanismen gleichzeitig nebeneinander nutzen können [57].

Ziel dieser Arbeit war es, weitere Mechanismen aufzudecken, welche für die ausgesprochene Malignität des duktaalen Adenokarzinoms des Pankreas sowie für seine Resistenz gegen gängige Chemotherapeutika und Radiatio verantwortlich sein können. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden zum Teil im FASEB Journal im Jahre 2005 publiziert [56]. Im Rahmen dieser Dissertation wurde insbesondere Augenmerk auf das Protein TRAF2 gelegt, welches in der vorliegenden Studie als Schlüsselprotein in der antiapoptotischen Signalkaskade in Pankreaskarzinomzellen identifiziert werden konnte.

Vorversuche der Arbeitsgruppe stellten dar, dass apoptoseresistente Tumorzelllinien im Vergleich zu weniger resistenten Zellen das Protein TRAF2 verstärkt exprimieren. Erstmals konnte überdies nachgewiesen werden, dass TRAF2 auch in soliden Pankreastumoren deutlich vermehrt exprimiert wird [56]. TRAF2 gehört zur Familie der TNF-Rezeptor assoziierten Faktoren, welche mehrere strukturell ähnliche Adapterproteine zusammenfasst. Diese regulieren unter Anderem Zellüberleben, aber auch Zelltod [54]. Von Gewebe zu Gewebe bestehen große Unterschiede in der Expression der einzelnen TRAF-Familienmitglieder. In einer groß angelegten Studie von Zapata et al. im Jahre 2000 [53] wurden verschiedene Gewebe immunhistochemisch auf das Vorkommen von TRAF1-6 untersucht. Diese Studie offenbarte, dass sowohl deutliche zelltypspezifische Unterschiede in Bezug auf das Expressionsmuster der einzelnen TRAF-Familienmitglieder bestehen, als auch diese zum Teil durch verschiedene Einflussfaktoren modelliert werden können. TRAF2 wird besonders ausgeprägt in Zellen des Immunsystems, wie Plasmazellen und Monozyten, exprimiert, zeigt jedoch in anderen Zelltypen eine nahezu ubiquitäre Expression. Ferner

wurde in der Studie dargestellt, dass die Menge an TRAF2-mRNA im Gewebe des normalen Pankreas niedrig ist [53]. Obwohl viele Studien TRAF2 eine entscheidende Rolle in der Vermittlung der Signaltransduktion, verbunden mit Proteinen der TNF-Rezeptor Familie zusprechen, ist wenig über die Regulation der TRAF2-Expression bekannt.

5.2 Mechanismen, die im Pankreaskarzinom zur TRAF2-Überexpression führen

Um auszuschließen, dass die TRAF2-Überexpression im Pankreastumorgewebe bereits auf Kernebene verankert sein könnte, wurden innerhalb der Arbeitsgruppe zunächst Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) -Analysen durchgeführt [56]. Chromosomale Veränderungen, die zu gesteigerter TRAF-Expression geführt hätten, konnten nicht detektiert werden, so dass genetische Aberrationen als mögliche Ursache aus den Überlegungen ausschieden [56].

Um die Ursache für die TRAF2-Überexpression weiter zu eruieren, wurde in der vorliegenden Dissertation der Einfluss von verschiedenen Signaltransduktionswegen auf die TRAF2-Expression untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Inhibitorstudie durchgeführt, in der verschiedene Signalwege in Colo357, Panc1, Panc89 und PancTul Zellen spezifisch gehemmt wurden (Abbildung 2A und 2B). Dabei ließ sich feststellen, dass die Inhibition des NF- κ B-Signalwegs durch MG132 zu einer eindrucklichen Reduktion der TRAF2-Expression in den untersuchten Zelllinien führte und NF- κ B somit scheinbar eine entscheidende Rolle in der TRAF2-Überexpression in Pankreaskarzinomzellen zugeschrieben werden kann. Gleiches galt für die Inhibition des MEK-Signalwegs durch UO126 in Panc89 und Colo357 Zellen. Kein Effekt war in Panc1 und PancTul Zellen zu beobachten. Dementsprechend scheint in diesen Zellen der MEK-Signalweg keine funktionelle Relevanz in Bezug auf die TRAF2-Expression zu haben.

Auf dem Boden dieser Erkenntnisse kam es zu der Überlegung, dass eine Induktion von NF- κ B konsekutiv zu einer Erhöhung der TRAF2-Expression führen könnte. Anhand der Stimulation der Zellen mit NF- κ B induzierenden Zytokinen wie TNF α oder IL-1 β kam es jedoch zu keiner Steigerung der TRAF2-Menge [56]. Dies lässt die Vermutung zu, dass eine Aktivierung von NF- κ B allein nicht für die TRAF2-Überexpression verantwortlich gemacht werden kann.

Von der Arbeitsgruppe wurde im Vorfeld bereits nachgewiesen, dass eine Hemmung von NF- κ B Pankreaskarzinomzellen gegenüber CD95-vermittelter Apoptose sensibilisiert [37]. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, die TRAF2 eine antiapoptotische Funktion zuschreiben und dessen Expression in direkte Abhängigkeit zur Menge des aktivierten NF- κ B setzen lassen, waren Grundlage für weitere Untersuchungen.

In Übereinstimmung mit den von unserer Arbeitsgruppe gewonnenen Ergebnissen, wurde von anderen Autoren ebenfalls beschrieben, dass einer gesteigerten konstitutiven NF- κ B-Aktivität eine Schlüsselrolle im Schutz vor CD95- und Chemotherapie-induzierter Apoptose zukommt [37, 66-68]. Die Ursache für eine gesteigerte Aktivierung von NF- κ B in neoplastischen Zellen kann genetisch bedingt sein, aber auch auf dem Level der Transkription seinen Ursprung finden [69, 70]. Zum Beispiel konnte für das klassische Hodgkin-Lymphom nachgewiesen werden, dass bei dieser Tumorerkrankung häufig eine chromosomale Aberration im „REL“-Gen, vorliegt. Diese Region kodiert für ein Mitglied aus der Familie der NF- κ B-Transkriptionsfaktoren. Die Mutation führt durch eine vermehrte Expression von cREL Proteinen zu einer erhöhten Aktivität von NF- κ B und somit zu verminderter Apoptose [71]. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien konnte mittels FISH-Analyse kein Anhalt für Mutationen auf chromosomaler Ebene nachgewiesen werden und auch Translokationen mit „Breakpoints“ waren in keinem der untersuchten Genloci identifizierbar [56]. Auf chromosomaler Ebene scheint die Ursache für die erhöhte NF- κ B-Aktivität demnach nicht zu finden zu sein.

Betrachtet man die Zelle im Ganzen gibt es als Ursache für vermehrte Aktivität eines Transkriptionsfaktors wie NF- κ B nicht nur die Zellkernebene, sondern auch Modulationen an anderer Stelle können hierfür verantwortlich sein. Intrazellulär sind das möglicherweise Fehlregulationen im Bereich verschiedenster Signalkaskaden, wie zum Beispiel dem MAP-Kinase Signalweg oder dem Todesrezeptor-vermittelten Signalweg. Des Weiteren kommt auch autokrine Stimulation ursächlich in Frage. Auf der Grundlage dieser Überlegungen, konnte angenommen werden, dass TRAF2 eines dieser modulierenden Proteine oder sogar das essentielle Protein ist, welches zu der beschriebenen Überaktivität von NF- κ B in apoptoseresistenten Pankreaskarzinomzellen führt. Bestärkt wird diese Theorie durch Versuche der Arbeitsgruppe von Fr PD Dr. Trauzold, in denen nachgewiesen werden konnte, dass eine TRAF2-Überexpression in den von uns verwendeten Pankreaskarzinomzelllinien in einer gesteigerten NF- κ B-Aktivität resultiert und dass die Hemmung von NF- κ B zu einer starken Reduktion von TRAF2 führen kann [56]. Ebenfalls haben andere Arbeitsgruppen vorangehend präsentieren können, dass die TRAF2-Expression durch NF- κ B stimuliert wird [25]. Dementsprechend scheint hier eine Verstärkerschleife mit positiver Rückkopplung vorzuliegen. Wie TRAF2 zu einer Steigerung der NF- κ B-Aktivität führt, ist bisher noch wenig untersucht und nicht genau in Zusammenhang zu bringen. Für Zytokine wie IL-1 β , welches NF- κ B TRAF2-abhängig aktivieren kann und dessen Sekretion für einige Pankrestumore nachgewiesen werden konnte [72, 73] oder die Hemmung des IL-1R, konnte von der Arbeitsgruppe im Vorfeld dieser Dissertation eine Beteiligung an der TRAF2-Expression in Colo357 Zellen ausgeschlossen werden [56].

Bekanntermaßen waren die in dieser Arbeit verwendeten Tumorzelllinien bis auf Colo357 überwiegend resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose [57]. Wurden die von uns transfizierten Colo357/TRAF2 Zellen mit CD95L inkubiert, führte dies bei ohnehin schon erhöhter konstitutiver NF- κ B-Aktivität nicht nur zu einer weiteren Steigerung der NF- κ B-Aktivität sondern, verglichen mit nicht transfizierten Colo357 Zellen, auch zu einer Zunahme der Apoptoseresistenz. Eine Behandlung der apoptosesensiblen Colo357/VK Zellen mit CD95L resultierte lediglich in einer geringgradigen Zunahme der konstitutiven NF- κ B-Aktivität nach 3 Stunden Behandlung. Aus diesen Ergebnissen deduziert, ist es sehr wahrscheinlich, dass eine durch TRAF2 gesteigerte Grundaktivität genauso wie die gesteigerte Aktivierung von NF- κ B nach Stimulation des CD95 Rezeptors, wie es in Colo357/TRAF2 Zellen beobachtet werden konnte, verantwortlich für die Apoptoseresistenz in den von uns untersuchten Pankreaskarzinomzellen ist. Unterstützend dazu konnte bereits 2001 von der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine Hemmung von NF- κ B nach CD95 Stimulation die Zellen sensibler gegenüber der über diesen Rezeptor vermittelten Apoptose macht [37].

5.3 Ursachen für eine gesteigerte Invasivität von Pankreaskarzinomzellen

Zusätzlich zur Apoptoseresistenz zeichnen sich Pankreaskarzinomzellen durch ihr ausgeprägtes Metastasierungsverhalten aus. Ursächlich dafür kann bekanntermaßen die Sezernierung einer Vielzahl proteolytischer Enzyme, wie MMPs und uPA, sowie verschiedener Zytokine, wie zum Beispiel IL-8, sein [58, 59]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von TRAF2 zur Steigerung der uPA- und IL-8-Expression führt (Abbildung 8). Gleiche Resultate gab es für die Matrix Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9, die durch die Arbeitsgruppe im Vorfeld erhoben wurden [56]. Die Ergebnisse implizieren, dass TRAF2 nicht nur Apoptose in Zusammenhang mit NF- κ B-Aktivierung verhindert, sondern dass auf Grund der Überexpression dieses Proteins auch das invasive Potential der untersuchten Zelllinien deutlich gesteigert wird. Interessanterweise führte die Behandlung von Colo357/VK Zellen mit Überständen von Colo357/TRAF2 Zellen zu einer fast identischen Invasivität wie bei den Colo357/TRAF2 Zellen, die mit eigenem Überstand behandelt wurden (Abbildung 10). Dies spricht für eine parakrine Stimulation. Möglicherweise sind genau die hohen Level an IL-8, uPA und auch MMPs, die in Zellkulturüberständen der TRAF2 Zellen gemessen werden konnten, für dieses Phänomen verantwortlich. Passend zu dieser Annahme konnte in Inhibitionsversuchen (der Arbeitsgruppe von PD Dr. Trauzold) demonstriert werden, dass die Hemmung von MMPs und uPA die Invasivität von Colo357/TRAF2 Zellen senkt [56].

Für Übergangsepithel-Tumorzellen aber auch für Pankreaskarzinomzellen wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass IL-8 die Invasivität dieser Zellen genauso wie die Angiogenese steigern kann [54, 74]. Für Übergangsepithel-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass das gesteigerte Tumorstadium und die Metastasierung auf die durch IL-8 vermittelte Steigerung der Expression und Aktivität von MMP-2 und MMP-9 zurückgeführt werden kann [74]. Daher ist auch bei den Colo357/TRAF2 Zellen davon auszugehen, dass IL-8 die Aktivierung von MMPs in diesen Zellen steigert.

5.4 Mechanismen CD95-vermittelter Apoptose-Resistenz durch TRAF2-Überexpression

Todesrezeptor-vermittelte Apoptose wird seit jeher intensiv untersucht und ist Gegenstand vieler Forschungsarbeiten. Nicht zuletzt, weil das Verstehen der Apoptose in gesundem und krankem Gewebe zum Verständnis und zur Behandlung vieler Krankheiten dienen kann. Auch der proapoptotische Signalweg über den CD95-Rezeptor ist ausführlich beschrieben [75]. Unklarheit herrscht jedoch über die Mechanismen, die eine durch diesen Rezeptor vermittelte Hemmung der Apoptose bedingen [25]. Dieses Phänomen wurde bereits 1993 von Alderson et al. beschrieben, als diese Gruppe zeigen konnte, dass es über den CD95-Rezeptor zur Proliferation von T-Zellen und Thymozyten kommen kann, ohne dass es gelang, diesen Effekt näher zu charakterisieren [76].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es uns, einige zu Grunde liegende Mechanismen dieser Beobachtung näher zu entschlüsseln.

Bekanntermaßen kann über den CD95-Rezeptor die Aktivierung von NF- κ B getriggert werden. Ebenfalls werden aber zum Beispiel auch die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Kaskaden, wie die *cJun N-terminal kinase* (JNK) Kaskade oder die p38 Kaskade, eine Kinasekaskade, die bei extrazellulären Stimuli in Bewegung gesetzt wird, aktiviert. Der JNK Signalweg kann durch viele Faktoren getriggert werden, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren, Zytokine aber auch Veränderungen in der Osmolarität der Zelle oder UV-Licht. Er ist an der Proliferation und Differenzierung von Zellen beteiligt, kann diese aber auch vor Apoptose schützen [77-79]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von IL-8 zumindest teilweise von aktivierten Caspasen abhängig zu sein scheint und die Zellen trotzdem resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose sind (Abbildung 8). Die Induktion von Apoptose auf dem normalen Wege ist von aktiven Caspasen abhängig. Eine Caspaseaktivierung kann über Todesrezeptoren allerdings auch unabhängig von Apoptose auftreten [11]. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass es über den CD95-Rezeptor oder TRAIL-vermittelt zu einer durch Caspasen induzierten

JNK-Aktivierung kommen kann [80, 81]. Die Mechanismen, die für die Trennung von Caspase-vermittelter Aktivierung der JNK und Apoptoseinduktion verantwortlich sind, sind Zelltyp-spezifisch und bis dato noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt Hinweise, dass eine Aktivierung von Caspasen, unabhängig von einer Apoptoseinduktion, für die Inhibierung von Apoptoseprozessen unterhalb des DISC verantwortlich ist. So zeigte sich, dass es in MCF7-Zellen, denen endogene Caspase 3 fehlt, trotz größerer Mengen aktivierter Caspase 8, nach Stimulation mit CD95L, nicht oder nur verzögert zur Initiierung der Apoptosemaschinerie kommt [82, 83]. Des Weiteren konnten Hinz et al. im Jahre 2000 zeigen, dass Bcl-xl Pankreaskarzinomzellen vor CD95- und TRAIL-vermittelter Apoptose schützen kann, ohne dass größerer Einfluss auf die Aktivierung von Caspase-8 genommen wurde [35].

Die Expression von IL-8 wird durch NF- κ B, p38 und JNK reguliert [84]. Dementsprechend könnte eine Caspase-vermittelte Aktivierung von JNK zur Produktion von IL-8 in Colo357/TRAF2 Zellen führen. Dies könnte auch die unterschiedlichen Ergebnisse in Bezug auf die Expression dieser Proteine nach Behandlung mit dem Caspasen-Inhibitor zVAD erklären, da die Aktivierung von JNK höchstwahrscheinlich unterschiedliche Effekte auf die Induktion von IL-8 und uPA hat. So scheint die Expression von IL-8 Caspasen- und damit wahrscheinlich auch JNK-abhängig zu sein, die von uPA hingegen nicht. Auch eine Aktivierung der p38 Kinase kommt ursächlich in gleicher Form in Frage. Für Colo357-BclxL Zellen und PancTul Zellen konnte eine CD95- und TRAIL-vermittelte Aktivierung von p38 nachgewiesen werden [85].

Von der Arbeitsgruppe konnte im Vorfeld gezeigt werden, dass es CD95-vermittelt zur Aktivierung von NF- κ B in PancTul Zellen kommt, welche große Menge an TRAF2 exprimieren [37]. Entsprechend dieser Ergebnisse führte eine Überexpression von TRAF2 in ursprünglich Apoptose-sensitiven Colo357 Zellen nicht nur zur Apoptoseresistenz, sondern hatte zusätzlich noch eine CD95-getriggerte Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP1 zur Folge und resultierte in einer gesteigerten Sezernierung von IL-8 und uPA (Abbildung 7 und 5). In den Colo357/VK Zellen, welche nur geringe Mengen an TRAF2 exprimieren, zeigte sich dieser Effekt nur geringgradig ausgeprägt. TRAF2 scheint ganz offensichtlich eine Schlüsselrolle in der Rettung der Zellen vor CD95-vermittelter Apoptose und der zusätzlichen Förderung der Zellinvasivität zu haben. Unterstützend zu dieser Theorie kommt noch hinzu, dass die Stimulation des CD95-Rezeptors, die ohnehin schon gesteigerte Sezernierung von uPA und IL-8 noch zusätzlich steigerte und so die Invasivität der Zellen weiter potenzierte (Abbildung 9). Diese Ergebnisse passen zu den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen. So beschreiben Peter et al., dass eine Aktivierung des CD95-Rezeptors in Apoptose-resistenten Tumorzellen in einer Steigerung der Expression bestimmter Gene, deren Produkte mit Invasion, Metastasierung und Apoptose-Resistenz verbunden sind, resultiert [86].

Trotz der hier präsentierten Ergebnisse, ist das komplexe Zusammenspiel von Todesrezeptoren, JNK, Zytokinen und Transkriptionsfaktoren sehr zelltypspezifisch und noch immer Gegenstand aktueller Untersuchungen.

5.5 Fazit

Die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse verdeutlichen, dass eine CD95-Stimulation bei TRAF2-Überexpression nicht zum Zelltod führt, sondern die Resistenz der Zellen gegenüber Apoptose fördert und parallel dazu deren Invasivität steigert. TRAF2 konnte in dieser Arbeit als wichtiger Malignitätsfaktor in Pankreastumorzellen identifiziert werden und dem CD95-Rezeptor eine duale Funktion zugesprochen werden. Neben der bekannten Vermittlung von Zelltod in Apoptose-sensitiven Zellen, führt die Stimulation des CD95-Rezeptors bei Zellen, die viel TRAF2 exprimieren, zur Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose und zu verstärktem invasiven Wachstum.

5.6 Medizinische Relevanz

Apoptose, die genetisch kontrollierte und evolutionär konservierte Form des programmierten Zelltods, spielt sowohl in der Embryogenese als auch bei der Gewebemöostase des adulten Organismus eine entscheidende Rolle. Gestörte Apoptose kann schwerwiegende degenerative Erkrankungen, Autoimmungeschehen und maligne Entartung zur Folge haben. Hier zeigen sich die zwei Gesichter antiapoptotischer Mediatoren, wie TRAF2. Auf der einen Seite sind physiologische Mengen an TRAF2 für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase erforderlich, andererseits führt dessen Überexpression zur Progression einiger Tumorerkrankungen, wie auch der des Pankreaskarzinoms. Gleiches gilt für den CD95-Rezeptor. Einerseits nutzt die körpereigene Abwehr diesen Rezeptor, um einen Todesreiz im Rahmen der normalen Gewebemöostase über zum Beispiel natürliche Killerzellen oder zytotoxische T-Zellen zu vermitteln [87, 88] und auch die moderne Medizin macht sich den CD95-Rezeptor zu nutze, um über diesen mittels Chemotherapeutika wie zum Beispiel 5-Fluorouracil Apoptose einzuleiten [89]. Andererseits jedoch können Tumorzellen über diesen Rezeptor vermitteltem Zelltod entgehen und werden durch CD95-Stimulation zur Invasion angeregt. In Zukunft gilt es, Strategien zu entwickeln, die TRAF2-Überexpression in Tumorzellen zu unterbinden, ohne die physiologischen Vorgänge in Zellen zu zerstören. Wir glauben, dass ein tiefergehendes Verständnis apoptotischer und nicht-apoptischer Todesrezeptor-vermittelter Signalwege im Rahmen von Gesundheit und Krankheit zur Prävention, Therapie und vielleicht sogar zur Heilung einer Vielzahl schwerwiegender Erkrankungen führen könnte.

6 Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom gehört zu den bösartigsten Tumorerkrankungen der westlichen Welt und hat eine ausgesprochen schlechte Prognose [1]. Es zeichnet sich durch seine hohe Apoptoseresistenz und sein frühes und ausgeprägtes metastatisches Potential aus, das die Therapie dieses Tumors zusätzlich zum schlechten Ansprechen auf Chemotherapie und Radiotherapie erschwert. In dieser Arbeit wurde das Adapter-Molekül TRAF2 als Schlüsselprotein in der Pathophysiologie des Pankreaskarzinoms und als verantwortlich für die Resistenz gegenüber CD95-Rezeptor vermittelter Apoptose, identifiziert. Das Einbringen eines TRAF2-exprimierenden Vektors in Apoptose-sensitive Colo357 Zellen führte zu deren Resistenz gegenüber CD95-vermittelter Apoptose und steigerte die Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP1. Zusätzlich bestand in den untersuchten Pankreaskarzinomzellen ein positiv-Feedback-Mechanismus, aufgrund dessen eine Hemmung von NF- κ B zur Abnahme der TRAF2-Expression führte und die Zunahme von TRAF2 in einer vermehrten NF- κ B-Expression resultierte. Weiterhin steigerte die TRAF2-Überexpression die Expression und Sekretion Invasivitäts-fördernder Proteine wie uPA und IL-8. Die hohe Apoptoseresistenz und die gesteigerte uPA-Sekretion konnte durch TRAF2-siRNA-Versuche rückgängig gemacht werden und so der direkte Zusammenhang zu TRAF2 in Bezug auf die uPA-Expression und -Sekretion hergestellt werden. Die Stimulation von TRAF2-überexprimierenden Zellen mit CD95L führte zur Induktion von NF- κ B und AP1. Zusätzlich nahm die IL-8- und uPA-Sekretion stark zu und die Invasivität der Pankreaskarzinomzellen wurde gesteigert. Neben der direkten Zunahme der Invasion der einzelnen Zelle bei TRAF2-Überexpression, bestand außerdem eine parakrine Stimulation im Zellverband, was die Malignität der Tumorzellen unterstützte. In der vorliegenden Arbeit konnte TRAF2 als wichtiger Malignitätsfaktor im Pankreaskarzinom identifiziert werden und dem CD95-Rezeptor eine duale Funktion zugesprochen werden. Neben der bekannten Vermittlung von Apoptose förderte eine Stimulation des CD95 Rezeptors in dieser Arbeit Zellüberleben und Invasion im Zusammenhang mit einer TRAF2-Überexpression. Der eigentliche Apoptose-Reiz führte zur Apoptose-Resistenz und parallel dazu zur Steigerung des invasiven Wachstums der Tumorzellen.

Wir glauben, dass die im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Erkenntnisse helfen, die hoch-komplexen Vorgänge im Rahmen der Apoptose besser zu verstehen. Des Weiteren gelang es uns zusätzliche Malignitäts-bedingende Eigenschaften des Pankreaskarzinoms zu identifizieren. Das Verständnis dieser Mechanismen im Gesunden und im Kranken könnte helfen, zukünftige Präventions- und Therapiestrategien für eine Vielzahl schwerwiegender Erkrankungen zu entwickeln.

7 Literatur

1. Lutz, M.P. and S. Pourebrahim, [*Pancreatic carcinoma*]. Internist (Berl), 2008. 49(9): S. 1079-86; quiz 1087.
2. RKI and GEKID, *Krebs in Deutschland 2003-2004 Häufigkeiten und Trends*. Robert Koch Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2008. 6. überarbeitete Auflage.
3. Kraus-Tiefenbacher, U., F.Lohr, M.Fuss¹ and F.Wenz, *Strahlentherapie beim Pankreaskarzinom*. JOURNAL ONKOLOGIE, 2003. 05-03.
4. Garcea, G., A.R. Dennison, C.J. Pattenden, C.P. Neal, C.D. Sutton and D.P. Berry, *Survival following curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. A systematic review of the literature*. Jop, 2008. 9(2): S. 99-132.
5. Hart, A.R., H. Kennedy and I. Harvey, *Pancreatic cancer: a review of the evidence on causation*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2008. 6(3): S. 275-82.
6. in *Pschyrembel*, H. Hildebrandt, Editor. 1998, de Gruyter: Berlin.
7. Vogt, C., *Untersuchungen über die Entwicklungen der Geburtshelferkröte (Alytes obstetricians)*. Solothurn: Jent und Gassmann, 1842: S. 130.
8. Kerr, J.F., A.H. Wyllie and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. 26(4): S. 239-57.
9. Wyllie, A.H., J.F. Kerr and A.R. Currie, *Cell death: the significance of apoptosis*. Int Rev Cytol, 1980. 68: S. 251-306.
10. Miyashita, T. and J.C. Reed, *Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line*. Blood, 1993. 81(1): S. 151-7.
11. Igney, F.H. and P.H. Krammer, *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis*. Nat Rev Cancer, 2002. 2(4): S. 277-88.
12. Itoh, N., S. Yonehara, A. Ishii, M. Yonehara, S. Mizushima, M. Sameshima, A. Hase, Y. Seto and S. Nagata, *The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis*. Cell, 1991. 66(2): S. 233-43.
13. Papoff, G., P. Hausler, A. Eramo, M.G. Pagano, G. Di Leve, A. Signore and G. Ruberti, *Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor*. J Biol Chem, 1999. 274(53): S. 38241-50.
14. Siegel, R.M., J.K. Frederiksen, D.A. Zacharias, F.K. Chan, M. Johnson, D. Lynch, R.Y. Tsien and M.J. Lenardo, *Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations*. Science, 2000. 288(5475): S. 2354-7.

15. Peter, M.E., C. Scaffidi, J.P. Medema, F. Kischkel and P.H. Krammer, *The death receptors*. Results Probl Cell Differ, 1999. 23: S. 25-63.
16. Kischkel, F.C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P.H. Krammer and M.E. Peter, *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor*. Embo J, 1995. 14(22): S. 5579-88.
17. Kischkel, F.C., D.A. Lawrence, A. Tinel, H. LeBlanc, A. Virmani, P. Schow, A. Gazdar, J. Blenis, D. Arnott and A. Ashkenazi, *Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8*. J Biol Chem, 2001. 276(49): S. 46639-46.
18. Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K.J. Tomaselli, K.M. Debatin, P.H. Krammer and M.E. Peter, *Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways*. Embo J, 1998. 17(6): S. 1675-87.
19. Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter and X. Wang, *Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors*. Cell, 1998. 94(4): S. 481-90.
20. Borner, C., *The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions*. Mol Immunol, 2003. 39(11): S. 615-47.
21. Esposito, M.D., *The roles of Bid*. Apoptosis, 2002. 7(5): S. 433-40.
22. Zamzami, N. and G. Kroemer, *The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. 2(1): S. 67-71.
23. Martinou, J.C. and D.R. Green, *Breaking the mitochondrial barrier*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. 2(1): S. 63-7.
24. Rathmell, J.C. and C.B. Thompson, *The central effectors of cell death in the immune system*. Annu Rev Immunol, 1999. 17: S. 781-828.
25. Wajant, H., K. Pfizenmaier and P. Scheurich, *Non-apoptotic Fas signaling*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. 14(1): S. 53-66.
26. Butler, L.M., P.J. Hewett, W.J. Butler and P.A. Cowled, *Down-regulation of Fas gene expression in colon cancer is not a result of allelic loss or gene rearrangement*. Br J Cancer, 1998. 77(9): S. 1454-9.
27. Loro, L.L., O.K. Vintermyr, A.C. Johannessen, P.G. Liavaag and R. Jonsson, *Suppression of Fas receptor and negative correlation of Fas ligand with differentiation and apoptosis in oral squamous cell carcinoma*. J Oral Pathol Med, 1999. 28(2): S. 82-7.

28. Ungefroren, H., M. Voss, M. Jansen, C. Roeder, D. Henne-Bruns, B. Kremer and H. Kalthoff, *Human pancreatic adenocarcinomas express Fas and Fas ligand yet are resistant to Fas-mediated apoptosis*. Cancer Res, 1998. 58(8): S. 1741-9.
29. Degli-Esposti, M.A., P.J. Smolak, H. Walczak, J. Waugh, C.P. Huang, R.F. DuBose, R.G. Goodwin and C.A. Smith, *Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family*. J Exp Med, 1997. 186(7): S. 1165-70.
30. Krueger, A., S. Baumann, P.H. Krammer and S. Kirchhoff, *FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis*. Mol Cell Biol, 2001. 21(24): S. 8247-54.
31. Eggert, A., M.A. Grotzer, T.J. Zuzak, B.R. Wiewrodt, R. Ho, N. Ikegaki and G.M. Brodeur, *Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression*. Cancer Res, 2001. 61(4): S. 1314-9.
32. Fulda, S., M.U. Kufer, E. Meyer, F. van Valen, B. Dockhorn-Dworniczak and K.M. Debatin, *Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer*. Oncogene, 2001. 20(41): S. 5865-77.
33. Irmeler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J.L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L.E. French and J. Tschopp, *Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP*. Nature, 1997. 388(6638): S. 190-5.
34. Irisarri, M., J. Plumas, T. Bonnefoix, M.C. Jacob, C. Roucard, M.A. Pasquier, J.J. Sotto and A. Lajmanovich, *Resistance to CD95-mediated apoptosis through constitutive c-FLIP expression in a non-Hodgkin's lymphoma B cell line*. Leukemia, 2000. 14(12): S. 2149-58.
35. Hinz, S., A. Trauzold, L. Boenicke, C. Sandberg, S. Beckmann, E. Bayer, H. Walczak, H. Kalthoff and H. Ungefroren, *Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis*. Oncogene, 2000. 19(48): S. 5477-86.
36. Scaffidi, C., I. Schmitz, J. Zha, S.J. Korsmeyer, P.H. Krammer and M.E. Peter, *Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells*. J Biol Chem, 1999. 274(32): S. 22532-8.
37. Trauzold, A., H. Wermann, A. Arlt, S. Schutze, H. Schafer, S. Oestern, C. Roder, H. Ungefroren, E. Lampe, M. Heinrich, H. Walczak and H. Kalthoff, *CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C and NF-kappaB contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells*. Oncogene, 2001. 20(31): S. 4258-69.
38. Sanz, L., P. Sanchez, M.J. Lallena, M.T. Diaz-Meco and J. Moscat, *The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF-kappaB activation*. Embo J, 1999. 18(11): S. 3044-53.

39. Mandal, M., S.B. Maggirwar, N. Sharma, S.H. Kaufmann, S.C. Sun and R. Kumar, *Bcl-2 prevents CD95 (Fas/APO-1)-induced degradation of lamin B and poly(ADP-ribose) polymerase and restores the NF-kappaB signaling pathway*. J Biol Chem, 1996. 271(48): S. 30354-9.
40. Wajant, H., E. Haas, R. Schwenzer, F. Muhlenbeck, S. Kreuz, G. Schubert, M. Grell, C. Smith and P. Scheurich, *Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD)*. J Biol Chem, 2000. 275(32): S. 24357-66.
41. Ponton, A., M.V. Clement and I. Stamenkovic, *The CD95 (APO-1/Fas) receptor activates NF-kappaB independently of its cytotoxic function*. J Biol Chem, 1996. 271(15): S. 8991-5.
42. Debatin, K.M. and P.H. Krammer, *Death receptors in chemotherapy and cancer*. Oncogene, 2004. 23(16): S. 2950-66.
43. Karin, M., Y. Cao, F.R. Greten and Z.W. Li, *NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit*. Nat Rev Cancer, 2002. 2(4): S. 301-10.
44. Hu, W. and J.J. Kavanagh, *Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway*. Lancet Oncol, 2003. 4(12): S. 721-9.
45. Stancovski, I. and D. Baltimore, *NF-kappaB activation: the I kappaB kinase revealed?* Cell, 1997. 91(3): S. 299-302.
46. Baeuerle, P.A. and D. Baltimore, *NF-kappa B: ten years after*. Cell, 1996. 87(1): S. 13-20.
47. Arch, R.H., R.W. Gedrich and C.B. Thompson, *Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death*. Genes Dev, 1998. 12(18): S. 2821-30.
48. Rothe, M., S.C. Wong, W.J. Henzel and D.V. Goeddel, *A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor*. Cell, 1994. 78(4): S. 681-92.
49. Cheng, G., A.M. Cleary, Z.S. Ye, D.I. Hong, S. Lederman and D. Baltimore, *Involvement of CRAF1, a relative of TRAF, in CD40 signaling*. Science, 1995. 267(5203): S. 1494-8.
50. Hsu, H., H.B. Shu, M.G. Pan and D.V. Goeddel, *TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways*. Cell, 1996. 84(2): S. 299-308.
51. Park, Y.C., V. Burkitt, A.R. Villa, L. Tong and H. Wu, *Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2*. Nature, 1999. 398(6727): S. 533-8.

52. Borden, K.L., M.N. Boddy, J. Lally, N.J. O'Reilly, S. Martin, K. Howe, E. Solomon and P.S. Freemont, *The solution structure of the RING finger domain from the acute promyelocytic leukaemia proto-oncoprotein PML*. Embo J, 1995. 14(7): S. 1532-41.
53. Zapata, J.M., M. Krajewska, S. Krajewski, S. Kitada, K. Welsh, A. Monks, N. McCloskey, J. Gordon, T.J. Kipps, R.D. Gascoyne, A. Shabaik and J.C. Reed, *TNFR-associated factor family protein expression in normal tissues and lymphoid malignancies*. J Immunol, 2000. 165(9): S. 5084-96.
54. Chung, J.Y., Y.C. Park, H. Ye and H. Wu, *All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction*. J Cell Sci, 2002. 115(Pt 4): S. 679-88.
55. Yeh, W.C., A. Shahinian, D. Speiser, J. Kraunus, F. Billia, A. Wakeham, J.L. de la Pompa, D. Ferrick, B. Hum, N. Iscove, P. Ohashi, M. Rothe, D.V. Goeddel and T.W. Mak, *Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice*. Immunity, 1997. 7(5): S. 715-25.
56. Trauzold, A., C. Roder, B. Sipos, K. Karsten, A. Arlt, P. Jiang, J.I. Martin-Subero, D. Siegmund, S. Muerkoster, L. Pagerols-Raluy, R. Siebert, H. Wajant and H. Kalthoff, *CD95 and TRAF2 promote invasiveness of pancreatic cancer cells*. Faseb J, 2005. 19(6): S. 620-2.
57. Trauzold, A., S. Schmiedel, C. Roder, C. Tams, M. Christgen, S. Oestern, A. Arlt, S. Westphal, M. Kapischke, H. Ungefroren and H. Kalthoff, *Multiple and synergistic deregulations of apoptosis-controlling genes in pancreatic carcinoma cells*. Br J Cancer, 2003. 89(9): S. 1714-21.
58. Harvey, S.R., T.C. Hurd, G. Markus, M.I. Martinick, R.M. Penetrante, D. Tan, P. Venkataraman, N. DeSouza, S.N. Sait, D.L. Driscoll and J.F. Gibbs, *Evaluation of urinary plasminogen activator, its receptor, matrix metalloproteinase-9, and von Willebrand factor in pancreatic cancer*. Clin Cancer Res, 2003. 9(13): S. 4935-43.
59. Koshiba, T., R. Hosotani, M. Wada, Y. Miyamoto, K. Fujimoto, J.U. Lee, R. Doi, S. Arii and M. Imamura, *Involvement of matrix metalloproteinase-2 activity in invasion and metastasis of pancreatic carcinoma*. Cancer, 1998. 82(4): S. 642-50.
60. Kuwada, Y., T. Sasaki, K. Morinaka, Y. Kitadai, N. Mukaida and K. Chayama, *Potential involvement of IL-8 and its receptors in the invasiveness of pancreatic cancer cells*. Int J Oncol, 2003. 22(4): S. 765-71.
61. Wang, W., J.L. Abbruzzese, D.B. Evans and P.J. Chiao, *Overexpression of urokinase-type plasminogen activator in pancreatic adenocarcinoma is regulated by constitutively activated RelA*. Oncogene, 1999. 18(32): S. 4554-63.
62. Sliva, D., D. English, D. Lyons and F.P. Lloyd, Jr., *Protein kinase C induces motility of breast cancers by upregulating secretion of urokinase-type plasminogen activator through activation of AP-1 and NF-kappaB*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. 290(1): S. 552-7.

63. Zhu, Y.M., D.A. Bradbury, L. Pang and A.J. Knox, *Transcriptional regulation of interleukin (IL)-8 by bradykinin in human airway smooth muscle cells involves prostanoid-dependent activation of AP-1 and nuclear factor (NF)-IL-6 and prostanoid-independent activation of NF-kappaB*. J Biol Chem, 2003. 278(31): S. 29366-75.
64. Ungefroren, H., M.L. Kruse, A. Trauzold, S. Roeschmann, C. Roeder, A. Arlt, D. Henne-Bruns and H. Kalthoff, *FAP-1 in pancreatic cancer cells: functional and mechanistic studies on its inhibitory role in CD95-mediated apoptosis*. J Cell Sci, 2001. 114(Pt 15): S. 2735-46.
65. Trauzold, A., S. Schmiedel, B. Sipos, H. Wermann, S. Westphal, C. Roder, W. Klapper, A. Arlt, L. Lehnert, H. Ungefroren, F.J. Johannes and H. Kalthoff, *PKCmu prevents CD95-mediated apoptosis and enhances proliferation in pancreatic tumour cells*. Oncogene, 2003. 22(55): S. 8939-47.
66. Arlt, A., A. Gehrz, S. Muerkoster, J. Vorndamm, M.L. Kruse, U.R. Folsch and H. Schafer, *Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death*. Oncogene, 2003. 22(21): S. 3243-51.
67. Arlt, A., J. Vorndamm, M. Breitenbroich, U.R. Folsch, H. Kalthoff, W.E. Schmidt and H. Schafer, *Inhibition of NF-kappaB sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin*. Oncogene, 2001. 20(7): S. 859-68.
68. Wang, W., J.L. Abbruzzese, D.B. Evans, L. Larry, K.R. Cleary and P.J. Chiao, *The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells*. Clin Cancer Res, 1999. 5(1): S. 119-27.
69. Ghadimi, B.M., E. Schrock, R.L. Walker, D. Wangsa, A. Jauho, P.S. Meltzer and T. Ried, *Specific chromosomal aberrations and amplification of the AIB1 nuclear receptor coactivator gene in pancreatic carcinomas*. Am J Pathol, 1999. 154(2): S. 525-36.
70. Curtis, L.J., Y. Li, M. Gerbault-Seureau, R. Kuick, A.M. Dutrillaux, G. Goubin, J. Fawcett, S. Cram, B. Dutrillaux, S. Hanash and M. Muleris, *Amplification of DNA sequences from chromosome 19q13.1 in human pancreatic cell lines*. Genomics, 1998. 53(1): S. 42-55.
71. Barth, T.F., J.I. Martin-Subero, S. Joos, C.K. Menz, C. Hasel, G. Mechttersheimer, R.M. Parwaresch, P. Lichter, R. Siebert and P. Moeller, *Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma*. Blood, 2003. 101(9): S. 3681-6.
72. Arlt, A., J. Vorndamm, S. Muerkoster, H. Yu, W.E. Schmidt, U.R. Folsch and H. Schafer, *Autocrine production of interleukin 1beta confers constitutive nuclear factor kappaB activity and chemoresistance in pancreatic carcinoma cell lines*. Cancer Res, 2002. 62(3): S. 910-6.
73. Jobin, C., L. Holt, C.A. Bradham, K. Streetz, D.A. Brenner and R.B. Sartor, *TNF receptor-associated factor-2 is involved in both IL-1 beta and TNF-alpha signaling*

- cascades leading to NF-kappa B activation and IL-8 expression in human intestinal epithelial cells.* J Immunol, 1999. 162(8): S. 4447-54.
74. Mian, B.M., C.P. Dinney, C.E. Bermejo, P. Sweeney, C. Tellez, X.D. Yang, J.M. Gudas, D.J. McConkey and M. Bar-Eli, *Fully human anti-interleukin 8 antibody inhibits tumor growth in orthotopic bladder cancer xenografts via down-regulation of matrix metalloproteases and nuclear factor-kappaB.* Clin Cancer Res, 2003. 9(8): S. 3167-75.
75. Peter, M.E. and P.H. Krammer, *The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond.* Cell Death Differ, 2003. 10(1): S. 26-35.
76. Alderson, M.R., R.J. Armitage, E. Maraskovsky, T.W. Tough, E. Roux, K. Schooley, F. Ramsdell and D.H. Lynch, *Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes.* J Exp Med, 1993. 178(6): S. 2231-5.
77. Davis, R.J., *Signal transduction by the JNK group of MAP kinases.* Cell, 2000. 103(2): S. 239-52.
78. Shaulian, E. and M. Karin, *AP-1 as a regulator of cell life and death.* Nat Cell Biol, 2002. 4(5): S. E131-6.
79. Pinkoski, M.J. and D.R. Green, *Fas ligand, death gene.* Cell Death Differ, 1999. 6(12): S. 1174-81.
80. Muhlenbeck, F., E. Haas, R. Schwenzer, G. Schubert, M. Grell, C. Smith, P. Scheurich and H. Wajant, *TRAIL/Apo2L activates c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) via caspase-dependent and caspase-independent pathways.* J Biol Chem, 1998. 273(49): S. 33091-8.
81. Choi, C., O. Kutsch, J. Park, T. Zhou, D.W. Seol and E.N. Benveniste, *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces caspase-dependent interleukin-8 expression and apoptosis in human astrogloma cells.* Mol Cell Biol, 2002. 22(3): S. 724-36.
82. Medema, J.P., C. Scaffidi, P.H. Krammer and M.E. Peter, *Bcl-xL acts downstream of caspase-8 activation by the CD95 death-inducing signaling complex.* J Biol Chem, 1998. 273(6): S. 3388-93.
83. Stegh, A.H., B.C. Barnhart, J. Volkland, A. Algeciras-Schimnich, N. Ke, J.C. Reed and M.E. Peter, *Inactivation of caspase-8 on mitochondria of Bcl-xL-expressing MCF7-Fas cells: role for the bifunctional apoptosis regulator protein.* J Biol Chem, 2002. 277(6): S. 4351-60.
84. Brat, D.J., A.C. Bellail and E.G. Van Meir, *The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis.* Neuro Oncol, 2005. 7(2): S. 122-33.
85. Siegmund, D., S. Klose, D. Zhou, B. Baumann, C. Roder, H. Kalthoff, H. Wajant and A. Trauzold, *Role of caspases in CD95L- and TRAIL-induced non-apoptotic signalling in pancreatic tumour cells.* Cell Signal, 2007. 19(6): S. 1172-84.

86. Peter, M.E., R.C. Budd, J. Desbarats, S.M. Hedrick, A.O. Hueber, M.K. Newell, L.B. Owen, R.M. Pope, J. Tschopp, H. Wajant, D. Wallach, R.H. Wilttrout, M. Zornig and D.H. Lynch, *The CD95 receptor: apoptosis revisited*. Cell, 2007. 129(3): S. 447-50.
87. Smyth, M.J., E. Cretney, J.M. Kelly, J.A. Westwood, S.E. Street, H. Yagita, K. Takeda, S.L. van Dommelen, M.A. Degli-Esposti and Y. Hayakawa, *Activation of NK cell cytotoxicity*. Mol Immunol, 2005. 42(4): S. 501-10.
88. Shresta, S., C.T. Pham, D.A. Thomas, T.A. Graubert and T.J. Ley, *How do cytotoxic lymphocytes kill their targets?* Curr Opin Immunol, 1998. 10(5): S. 581-7.
89. Mahmood, Z. and Y. Shukla, *Death receptors: Targets for cancer therapy*. Exp Cell Res. 316(6): S. 887-899.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Privatdozentin Dr. Anna Trauzold bedanken, die mir das Thema der vorliegenden Arbeit überlassen hat. Des Weiteren möchte ich ihr für ihr Vertrauen, ihre Unterstützung und ihre Förderung in den letzten Jahren danken. Weiterhin danke ich ihr für die Durchsicht und Korrektur der vorliegenden Arbeit.

Weiterer Dank gebührt Herrn Professor Holger Kalthoff, in dessen Institut die Arbeit entstanden ist. Ohne seine Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Gleiches gilt auch für die Mitarbeiter des Instituts, im Besonderen Dr. Christian Röder und Harald Boigs, die mir häufig mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Danken möchte ich auch meinem langjährigen Freund Mitstreiter Benjamin Bohm, der gemeinsam mit mir viele Stunden im Labor verbracht hat.

Zudem möchte ich mich bei meinen Freunden Julia Kernbichler, Ria Engelhardt, Maïke Heitmann, Benedikt Westphalen und Malte Claussen, bedanken, die für viele wertvolle Diskussionen, Kritik und Anregungen gesorgt haben und mich in jeder Hinsicht unterstützt haben und es noch immer tun.

Insbesondere danke ich Benedikt Westphalen für die ausführliche Korrektur der vorliegenden Arbeit.

Möglich geworden ist diese Arbeit nur durch die großartige Unterstützung, die ich durch meine Familie erfahren habe und noch immer erfahre.

Vielen Dank, dass Ihr es mir ermöglicht habt, diesen Weg zu gehen.

Lebenslauf

Persönliche Daten	
Name	Kristin Karsten
Adresse	Eppendorfer Weg 89, 20259 Hamburg
E-Mail Adresse	Kristinkarsten@web.de
Geburtstag / -ort	23.04.1982 in Rotenburg/Wümme
Nationalität	deutsch

Ausbildung	
Weiterbildung Seit 02/2008	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Assistenzärztin in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie Zentrum für Anästhesiologie und Intensivmedizin Direktor: Prof. Dr. med. Alwin E. Goetz
Studium 10/01-12/07	Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Studium der Medizin <i>Physikumsnote: 2,7</i> <i>Staatsexamensnote: gut</i>
Praktisches Jahr 08/06-07/07	<ul style="list-style-type: none"> • 1. Tertial: Anästhesie im Friedrich-Ebert-Krankenhaus Neumünster, Lehrkrankenhaus der Universitätsklinik Kiel • 2. Tertial: Chirurgie in der Universitätsklinik Kiel • 3. Tertial: Innere Medizin im Kantonsspital Laufen (Lehrkrankenhaus der Universität Basel), Schweiz
Famulaturen	<ul style="list-style-type: none"> • Aug./Sept. 2004: Chirurgie, Praxisklinik Kiel • März 2005: Innere Medizin mit Schwerpunkt Kardiologie, Diakoniekrankenhaus Rotenburg/Wümme • Juli/Aug. 2005: Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel • Feb./März 2006: Klinik für Plastische Chirurgie, Rekonstruktive Chirurgie und Handchirurgie, Diakoniekrankenhaus Rotenburg/Wümme
Schulbildung	07/2001: Abitur, <i>Note: 1,9</i> <ul style="list-style-type: none"> • 1994-2001 Ratsgymnasium Rotenburg • 1992-1994 Orientierungsstufe Freudenthalstraße, Rotenburg

Fremdsprachen	<ul style="list-style-type: none"> • 1998-1992 Stadtschule Rotenburg • Englisch: Fließend in Wort und Schrift • Französisch: umfangreiche Grundkenntnisse • Spanisch: Grundkenntnisse • Latein: Kleines Latinum
----------------------	--

Praktische Erfahrung	
2004 bis 2007	Operationsassistentz bei Dr. med. Christian Sellschopp (Endokriner Chirurg), Parkklinik Kiel Assistenz am Operationstisch auch zur ersten Hand, Narkose-Vorbereitung und –Nachbereitung
2004 & 2005	Anstellung als Studentische Hilfskraft in der Sektion Molekulare Onkologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel Wissenschaftliche Mitarbeit in der Apoptoseforschung mit Pankreaskarzinomzellen

Dissertation	
Seit 2003	Institut für Experimentelle Tumorforschung, Sektion Molekulare Onkologie, Krebszentrum Nord-CCC, UKSH, Campus Kiel Betreuerin: PD Dr. Anna Trauzold Institutsdirektor: Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff
Co-Autoren-schaft 01/2005	The FASEB Journal (2005): A. Trauzold, C. Röder, B. Sipos, <u>K. Karsten</u> , A. Arlt, P. Jiang, J.I. Martin-Subero, D. Siegmund, S. Muerköster, L. Pagerols-Raluy, R. Siebert, H. Wajant and H. Kalthoff, <i>CD95 and TRAF2 promote invasiveness of pancreatic cancer cells</i> . FASEB J, (2005). 19(6): S. 620-2.
Vortrag 05/2005	6th Congress of the European Hepato Pancreato Biliary Association Thema: TRAF2 and the CD 95 death receptor mediate invasiveness of pancreatic cancer cells

Persönliches	
Hobbies	Laufen, Aerobic, Skifahren

Appendix

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

A. Trauzold, C. Roder, B. Sipos, K. Karsten, A. Arlt, P. Jiang, J.I. Martin-Subero, D. Siegmund, S. Muerkoster, L. Pagerols-Raluy, R. Siebert, H. Wajant and H. Kalthoff: "CD95 and TRAF2 promote invasiveness of pancreatic cancer cells." *Faseb J*, 2005. 19(6): S. 620-2.